

Aus der
Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie
Direktor: Prof. Dr. med. G. Steinhoff
der Universität Rostock

**Einfluss der Ischämischen Fernkonditionierung
auf zirkulierende endotheliale Zellen und Zytokine
im Rahmen der RIPHeart-Studie**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von

Anna Stockheim (geb. Baresel), geb. am 21.09.1988 in Berlin-Friedrichshain
aus Rostock

Rostock, 2015

Dekan: Prof. Dr. med. univ. Emil C. Reisinger

Gutachter:

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Gustav, Steinhoff
Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie, Universität Rostock
2. Gutachter: Prof. Dr. med. habil. Christof Stamm
Deutsches Herzzentrum Berlin, Charité Berlin
3. Gutachter: Prof. Dr. med. habil. Brigitte Vollmar
Rudolf-Zenker- Institut für Experimentelle Chirurgie, Universität
Rostock

Datum der Einreichung: 21.09.2015

Datum der Verteidigung: 26.04.2016

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einführung	1
1.1 Einleitung – Kardiochirurgie	1
1.2 Ischämische Konditionierung	2
1.3 RIPHeart-Studie	4
1.4 Myokardiale Regeneration durch Stammzellen	6
1.5 Zytokine	10
1.6 Zielsetzung der Arbeit	14
2 Material und Methoden	15
2.1 Studienpopulation	15
2.2 Zeitlicher Ablauf der Probenentnahme	17
2.3 Labortechnische Methoden	17
2.3.1 Isolierung peripherer mononukleärer Zellen aus menschlichem Blut ...	17
2.3.2 FACS-Analyse/ Durchflusszytometrie	18
2.3.3 Zytokinanalyse	22
2.4 Statistische Auswertung	25
3 Resultate	27
3.1 Zytokinanalyse	27
3.1.1 Deskriptive Statistik	27
3.1.2 TNF	30
3.1.3 IL-1 β	32
3.1.4 IL-6	32
3.1.5 IL-8	33
3.1.6 IL-10	34

3.1.7	bFGF	35
3.1.8	VEGF.....	36
3.1.9	G-CSF	38
3.2	Analyse zirkulierender Endothelzellen (CEC).....	39
3.2.1	Deskriptive Statistik	39
3.2.2	CD45-negative, CD146-positive, CD31-positive Zellen	40
3.2.3	CD45-negative, CD146-positive, CD31-positive, CD105-positive Zellen.....	41
3.2.4	CD45-negative, CD146-positive, CD105-positive Zellen	42
3.2.5	CD45-negative, CD146-positive, CD105-positive, CD34-positive Zellen.....	44
3.2.6	CEC-Zellen	45
3.2.7	CD45-negative bis schwach positive, CD34-positive, CD133-negative, CD146-positive Zellen	46
3.2.8	CD45-negative bis schwach positive, CD34-positive, CD133-positive, CD146-negative Zellen.....	46
3.2.9	CD45-negative bis schwach positive, CD34-positive, CD133-positive Zellen.....	47
4	Diskussion.....	49
5	Zusammenfassung.....	57
6	Literaturverzeichnis	59
	Anhang	X
	Thesen	X
	Selbständigkeitserklärung	XI
	Danksagung.....	XII
	Lebenslauf	XIV

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über erhobene Parameter zu den Messzeitpunkten im Rahmen der RIPHeart-Studie.....	5
Tabelle 2: Übersicht verwendeter CD-Marker, deren charakteristische Expression auf Zellen sowie deren Funktion (Ausschnitt aus Quelle: BD Biosciences 2010) ..	8
Tabelle 3: Übersicht über die Zytokine (Löffler et al. 2007, S. 759, 777ff.)	10
Tabelle 4: Ausschlusskriterien der RIPHeart-Studie	15
Tabelle 5: Zeitpunkte der Probenentnahme.....	17
Tabelle 6: Verwendete Antikörper für Durchflusszytometrie	19
Tabelle 7: Absolute und Relative Häufigkeit der kategorial eingeordneten Ejektionsfraktionen.....	29

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung zur Stimulierung zirkulierender Endothelzellen (nach Schmidt et al. 2015)	9
Abbildung 2: Gating-Strategie für CEC-Zellen	20
Abbildung 3: Gating-Strategie für zirkulierende Endothelzellen und zirkulierende endotheliale Progenitorzellen nach Mariucci et al. (2010)	21
Abbildung 4: Prinzip der "CBA" (nach BD Biosciences- Assay Principle 2013)	23
Abbildung 5: Ablauf der CBA	25
Abbildung 6: Gruppierte Altersverteilung der Zytokinanalyse	27
Abbildung 7: Geschlechterverteilung	28
Abbildung 8: Verteilung der Operationsarten in Interventions- und Kontrollgruppe ..	29
Abbildung 9: Zeitlicher Mittelwertverlauf von TNF in Interventions- und Kontrollgruppe	31
Abbildung 10: Zeitlicher Mittelwertverlauf von IL-6 in Interventions- und Kontrollgruppe	32
Abbildung 11: Zeitlicher Mittelwertverlauf von IL-8 in Interventions- und Kontrollgruppe	33
Abbildung 12: Zeitlicher Mittelwertverlauf von IL-10 in Interventions- und Kontrollgruppe	35
Abbildung 13: Zeitlicher Mittelwertverlauf von VEGF in Interventions- und Kontrollgruppe	37
Abbildung 14: Zeitlicher Mittelwertverlauf von G-CSF in Interventions- und Kontrollgruppe	38
Abbildung 15: Gruppierte Altersverteilung der CEC- Analyse.....	39
Abbildung 16: Zeitlicher Mittelwertverlauf von CD45- CD146+ CD31+ Zellen in Interventions- und Kontrollgruppe.....	41
Abbildung 17: Zeitlicher Mittelwertverlauf von CD45- CD146+ CD31+ CD 105+ Zellen in Interventions- und Kontrollgruppe.....	42
Abbildung 18: Zeitlicher Mittelwertverlauf von CD45- CD146+ CD 105+ Zellen in Interventions- und Kontrollgruppe.....	43
Abbildung 19: Zeitlicher Mittelwertverlauf von CD45- CD146+ CD 105+ CD34+ Zellen in Interventions- und Kontrollgruppe.....	44

Abbildung 20: Zeitlicher Mittelwertverlauf von CEC-Zellen in Interventions- und Kontrollgruppe.....	45
Abbildung 21: Zeitlicher Mittelwertverlauf von CD45-/dim CD34+ CD 133+ CD146- Zellen in Interventions- und Kontrollgruppe	47
Abbildung 22: Zeitlicher Mittelwertverlauf von CD45-/dim CD34+ CD133+ Zellen in Interventions- und Kontrollgruppe.....	48

Abkürzungsverzeichnis

ACB	aortokoronarer Bypass
APC	Fluorochrom Allophycocyanin
APC-Cy7	Fluorochrom Allophycocyanin und Cyanide Dye
CBA	Cytometric Bead Array
CD	Differentierungsmarker auf Zelloberfläche (cluster of differentiation)
CEC	zirkulierende endotheliale Zellen
CEP	zirkulierende endotheliale Progenitorzellen
CK-MB	Kreatinkinase Muskel- Gehirn (muscle-brain type CK)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPC	endotheliale Progenitorzellen
FcR	Membranrezeptoren für Immunglobuline
(b)FGF	(basaler) Fibroblasten-Wachstumsfaktor
FGFR	Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor
FITC	Fluorochrom Fluoresceinisothiocyanat
FMO	Gatingverfahren „fluorescence minus one“
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor
ICD	Internationale statistische Krankheitsklassifikation
IL	Interleukin
LSM	Leukozytenseparationsmedium
NIH	Nationales Institut für Gesundheit der Vereinigten Staaten von Amerika
MACS	spezielle Pufferungslösung aus PBS und EDTA
MW	Mittelwert
OP	Operation
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung

PC	Computer
PE	Fluorochrome R-Phycoerythrin
PE-Cy7	Fluorochrome R-Phycoerythrin und Cyanide Dye
PerCP-Cy5.5	Fluorochrome Glutathionphotosyntheseanteil und Cyanide Dye
PKC	Proteinkinase C
RIP	Permanente Ischämische Prekonditionierung
repANOVA	Varianzanalyse mit Messwiederholung
RKI	Robert-Koch-Institut
SAFE	Verstärkung eines Überlebensaktivierungs-Faktors
SD	Standardsabweichung
STAT 3	spezieller Transkriptionsfaktor
T0-T3	Zeitpunkte 0-3
TNF- α	Tumornekrosefaktor Alpha
VEGF	Vaskulärer-Endothelialer Wachstumsfaktor
VEGFR	Vaskulärer-Endothelialer Wachstumsfaktor-Rezeptor

1 Einführung

1.1 Einleitung – Kardiochirurgie

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind in den westlichen Industrienationen sowohl hinsichtlich ihrer Häufigkeit als auch Sterblichkeitsrate von immenser wissenschaftlicher Bedeutung. Dies wird durch die Tatsache, dass die chronisch ischämische Herzkrankheit (ICD-I25), der akute Myokardinfarkt (ICD-I21) und die Herzinsuffizienz (ICD-I50) die drei häufigsten Todesursachen in Deutschland darstellen, belegt (Gesundheitsberichterstattung des Bundes 2013b). Die Lebenszeitprävalenz kardiovaskulärer Erkrankungen bei 40- bis 79-jährigen Frauen und Männern in Deutschland zwischen 2008 und 2011 betrug 4,7% (RKI 2013).

Je nach Art und Schweregrad der Erkrankung und je nach Zustand des Patienten gibt es zahlreiche Behandlungsmöglichkeiten. Dazu zählen unter anderem auch operative Eingriffe am Herzen.

Die Entwicklung der extrakorporalen Zirkulation, häufig auch als Herz-Lungen-Maschine bezeichnet, durch John Gibbon (Philadelphia), John Kirklin (Mayo-Klinik) und Walton Lillehei (Minneapolis) legte 1953 den Grundstein für kardiochirurgische Eingriffe, wie sie heute angewandt werden (Ziemer und Haverich 2010).

Im Jahr 2010 wurden in Deutschland 84.686 kardiochirurgische Eingriffe unter Einsatz der Herz-Lungen-Maschine durchgeführt (Gesundheitsberichterstattung des Bundes 2013a). Koronar- und Klappenchirurgie wurden zu 87,6% an der Herz-Lungen-Maschine durchgeführt (Gesundheitsberichterstattung des Bundes 2013a).

Die extrakorporale Zirkulation dient bei Herzoperationen dem Erhalt der Herz-Kreislauf-Funktion und beeinflusst Hämodynamik, Gasaustausch sowie den gesamten Organismus. Eine Antikoagulation ist für den nicht-physiologischen Kontakt des Blutes mit künstlichen Materialien unabdingbar, beeinträchtigt jedoch auch die Funktion der Endorgane. Des Weiteren muss für einen längeren Herzstillstand eine kardioplegische Lösung verwendet werden. Folgeschäden durch den Einsatz der extrakorporalen Zirkulation finden sich an Hormonhaushalt, Gerinnungssystem, Immunsystem und den Endorganfunktionen (Schmid und Philipp 2011, S. 24).

Balibrea et al. beschrieben 1975 nach Studien an Hunden die Schädigung myokardialer Zellen bei längeren Anoxämiezeiten und fanden heraus, dass eine

intermittierende Niedrigdruck- Perfusion im Abstand von 30 Minuten am Myokard zu keinerlei histologischen Veränderungen führt. Die histologische Betrachtung der Myokardzellen, die einer 60-minütigen Anoxie unterzogen wurden, zeigte hingegen mitochondriale Veränderungen sowie ein Auseinanderweichen der Glanzstreifen.

Ebenfalls 1975 beschrieben Varga et al. die Auswirkungen der extrakorporalen Zirkulation an 20 Patienten unter milder Hypothermie (30°C) und sahen nach 20 Minuten Anoxämiezeit morphologische Veränderungen des Myokards, die nach 43 bis 45 Minuten zu irreversiblen Schäden führten.

Aus solchen und anderen Ergebnissen resultierte die Notwendigkeit zur Myokardprotektion, um einerseits ideale Voraussetzungen für den kardiochirurgischen Eingriff zu schaffen und andererseits das Myokard vor zusätzlichen Schäden durch die Operation zu schützen. Der heutige Standard der Myokardprotektion besteht darin, bereits vor dem Eingriff eine optimale hämodynamische Ausgangslage des Patienten zu schaffen. Während der extrakorporalen Zirkulation sollte eine ausreichende Perfusion geschaffen und das metabolische Milieu optimiert werden. Der Schutz des Herzens wird über Hypothermie und den pharmakologisch herbeigeführten Herzstillstand (Kardioplegie) erreicht, wodurch der Energiebedarf gesenkt wird und längere Ischämiezeiten toleriert werden können (Schmid und Philipp 2011, S. 30ff.).

Unter ischämischen Bedingungen ist das Myokard dank der Myokardprotektion weitestgehend geschützt, während der Reperfusionsphase hingegen führen biochemische Veränderungen wie die Bildung von Sauerstoffradikalen nach der Wiederherstellung der Durchblutung im Gewebe zu einem Reperfusionsschaden (Bernink et al. 2013).

Ziel aktueller wissenschaftlicher Untersuchungen ist es, den Reperfusionsschaden zu verringern und so ein besseres Outcome des Patienten zu erreichen. Zu den untersuchten Methoden gehören Pharmakotherapie, hyperbare Oxygenierung sowie die ischämische Konditionierung (Bernink et al. 2013).

1.2 Ischämische Konditionierung

Eine Ischämie ist eine Blutminderversorgung des Gewebes, wobei zwischen absoluter und relativer Ischämie unterschieden wird. Während bei der absoluten Ischämie die Zellen im betroffenen Areal absterben, kann das Gewebe bei der relativen Ischämie noch mit Blut versorgt werden, beispielsweise über Kollateralgefäße. Bei einem Myokardinfarkt liegt eine absolute Ischämie vor (Bühling et al. 2008, S. 181). Um die

Ausdehnung des Infarktareals zu vermindern und das Herz auf den Schaden „vorzubereiten“, überprüften Murry et al. (1986), ob durch relative ischämische Episoden vor dem Infarktgeschehen eine protektive Wirkung erreicht werden kann. Der Anlass für die Untersuchung war die Beobachtung, dass Patienten, die vor einem Herzinfarkt Episoden von Angina pectoris verspürten, eine bessere Prognose besaßen.

Murry et al. (1986) untersuchten die Auswirkung von kurzen Ischämien vor dem eigentlichen Infarktgeschehen an Hunden und fanden heraus, dass Ischämische Vorkonditionierung durch Ballonokklusion des Ramus circumflexus (das um die linke Herzkammer verlaufende Herzkranzgefäß) die Infarktgröße um etwa 25% reduziert. Die Annahme, dass vorausgehende ischämische Ereignisse im Herzen Schutzmechanismen auslösen, ließ die Methode als hoffnungsvolle Maßnahme auch zur Verminderung des Reperfusionsschadens erscheinen. Am Menschen wurde der Myokardschutz durch Ischämische Konditionierung erstmals von Yellon et al. 1993 angewandt. Die Metaanalyse von Walsh et al. 2008 weist darauf hin, dass Ischämische Vorkonditionierung die Häufigkeit ventrikulärer Arrhythmien, den Bedarf vasoaktiver Medikamente und die Verweildauer auf der Intensivstation signifikant verringerte.

Da eine Vorkonditionierung bei Patienten mit bereits bestehendem, akutem Koronarsyndrom nicht mehr durchführbar ist, wurden Effekte der Ischämischen Nachkonditionierung untersucht. Entsprechende Studienergebnisse variieren jedoch stark. Zum einen konnte gezeigt werden, dass auch Ischämische Nachkonditionierung die Infarktgröße reduzieren kann (Lønborg et al. 2010, Staat et al. 2005, Zhao et al. 2003, Yang et al. 2007) sowie zu einem Langzeitnutzen führt (Thibault et al. 2008). Auch eine schnellere Verbesserung der Koronardurchblutung und Wandmotilität konnte nachgewiesen werden (Ma et al. 2006). Andere Studien wie die von Sörensson et al. (2010) zeigten geringere Effekte durch Ischämische Nachkonditionierung und gaben nur Auswirkungen auf sehr große Infarktgeschehen an. Neben der bislang unklaren Wirksamkeit der Nachkonditionierung ist vor allem die Invasivität der Methode kritisch zu hinterfragen (Bernink et al. 2013).

Die bisher beschriebenen Ergebnisse wurden jeweils durch invasive Vorbehandlung am Herzen erreicht. Als vielversprechende, nicht-invasive Methode zur Reduktion des Reperfusionsschadens gilt daher die Ischämische Fernkonditionierung („remote ischemic preconditioning“), bei der eine Konditionierung des Herzens durch Ischämische Vorbehandlung einer Herz-fernen Region ausgelöst wird. Przyklenk et al.

(1993) untersuchten, ob die Ischämische Vorkonditionierung in einem Durchblutungsareal am Herzen eine davon entfernte Herzregion vor den Folgen eines Koronararterienverschlusses schützen kann. Sie mutmaßten, dass die Effekte über Mediatoren ausgelöst werden, die von einem Areal zum anderen gelangen. Eine Studie an Mäusen zeigte, dass an der Vermittlung der Wirkung einer Fernkonditionierung sowohl neuronale als auch humorale Verbindungen beteiligt sind (Lim et al. 2010).

Eine Fernkonditionierung ist ebenso effektiv wie die Vorkonditionierung direkt am Zielgewebe (Gho et al. 1996, Loukogeorgakis et al. 2005). Dies deutet wiederum darauf hin, dass bei beiden Vorgehensweisen ähnliche Mechanismen beteiligt sind. Bei der Vermittlung ist Adenosin ebenso wie Bradykinin beteiligt (Liu et al. 1991, Schoemaker und van Heijningen 2000). Bradykinin und Adenosin aktivieren zudem die Proteinkinase C (Goto et al. 1995), welche für die Signaltransduktion, die Wachstumsregulation und Differenzierungsvermittlung von Bedeutung sind (Löffler et al. 2007, S. 789). Bei der Fernkonditionierung spielt die myokardiale Isoform der Proteinkinase C-Epsilon (PKC ϵ) eine wichtige Rolle (Wolfrum et al. 2002).

Ziel aktueller Untersuchungen ist es, die Effektivität der Fernkonditionierung für den klinischen Alltag zu bewerten, das optimale Zeitfenster festzustellen und die Hintergründe der Wirkungsweise näher zu beleuchten.

1.3 RIPHeart-Studie

Die RIPHeart-Studie (RIPHeart-Study) (ClinicalTrials.gov Identifier:

NCT01067703) untersucht Ischämische Fernkonditionierung für herzchirurgische Patienten (Remote Ischaemic Preconditioning for Heart Surgery). Es handelt sich um eine interventionelle, von der Universität Schleswig-Holstein initiierte Multicenterstudie in Zusammenarbeit mit den Universitätskliniken Aachen (RWTH), Berlin (Charité), Bonn, Frankfurt am Main, Göttingen, Kiel, Lübeck, Rostock und Würzburg.

Sie entspricht einer kontrollierten, randomisierten Doppelblindstudie (Verblindung für Patient, Pflegepersonal, Forschungspersonal und Begutachter). Der Erhebungszeitraum ist auf Dezember 2010 bis April 2016 eingegrenzt.

Die Interventionsgruppe (RIPC) erhält nach Narkoseeinleitung vier Zyklen einer fünfminütigen Ischämie gefolgt von fünfminütiger Reperfusion an der oberen Extremität. Hierzu wird eine Blutdruckmanschette angebracht und mit 200 mmHg aufgepumpt. Der Druck sollte mindestens 20 mmHg höher sein als der arteriell

gemessene systolische Blutdruckwert des Patienten. In der Kontrollgruppe (CONTROL) wird dieselbe Prozedur an einem Dummy-Arm durchgeführt.

Es gilt, die Effekte der Ischämischen Fernkonditionierung (im Weiteren auch als „RIP-Behandlung“ bezeichnet) auf perioperative ischämische Schädigungen an erwarteten 2070 Patienten herauszufinden.

Tabelle 1: Übersicht über erhobene Parameter zu den Messzeitpunkten im Rahmen der RIPHeart-Studie

<i>Parameter</i>	<i>Messzeitpunkte</i>
<ul style="list-style-type: none"> - Gesamtmortalität - Zahl nicht-tödlicher Myokardinfarkte - Schlaganfall (neu aufgetreten) und/oder - Nierenversagen 	<ul style="list-style-type: none"> - während des Krankenhausaufenthalts - nach Entlassung - 3 Monate post-operativ - 12 Monate post-operativ
- Dauer des Aufenthalts auf der Intensivstation	- post-operativ
- Dauer des Krankenhausaufenthalts	- zum Entlassungszeitpunkt
- Vorhofflimmern (neu aufgetreten)	- während des Krankenhausaufenthalts
- Delirium	- 24h/ 48h/ 72h/ 96h post-operativ

Im Rahmen der RIPHeart-Studie soll mit den erhobenen Parametern untersucht werden, ob die RIP-Behandlung gravierende Auswirkungen vermindert, die durch eine perioperative, ischämische Schädigung im Rahmen einer Herzoperation unter Verwendung der Herz-Lungen-Maschine auftreten können. Zudem wird untersucht, ob mit diesem Verfahren eine Risikoreduktion um ein Drittel für schwerwiegende Nebenwirkungen (wie Myokardinfarkt, Schlaganfall, Nierenschädigung und weitere) erreicht werden kann (Meybohm 2013).

1.4 Myokardiale Regeneration durch Stammzellen

Stammzellen sind Zellen mit Selbsterneuerungskapazität und der Möglichkeit, sich in andere Zelltypen zu differenzieren. Je nach Umfang dieser Möglichkeiten werden unterschiedliche Arten von Stammzellen unterschieden (Korbling et al. 2003):

1. Totipotente Zellen sind solche, aus denen sich ein ganzer Organismus entwickeln kann, zu ihnen zählen frühe Embryonalzellen (im Blastomerstadium).
2. Pluripotente Zellen können sich nicht mehr zu ganzen Organismen differenzieren, da sich aus ihnen keine Trophoblastzellen mehr entwickeln können. Jedoch entstehen aus ihnen die Zellen der drei Keimblätter: Endoderm, Ektoderm und Mesoderm, einschließlich Kardiomyozyten (Boheler et al. 2002).

Weiterhin werden embryonale und adulte Stammzellen unterschieden. Während adulte oder auch multipotente Stammzellen ein nicht mehr so umfangreiches Differenzierungspotential aufweisen, ist deren Entnahme vom Patienten einfacher und unter ethisch- moralischen Aspekten akzeptabler. Die Verwendung embryonaler Stammzellen ist in Deutschland durch das Embryonenschutzgesetz verboten, da es ethisch unvertretbar gilt (Bundesministerium der Justiz 1990; zuletzt geändert 2011). Lange wurde das menschliche Herz als „postmitotisches Organ“ ohne Potential zur Regenerierung betrachtet, da sich die Zahl der Myozyten im Laufe des Lebens relativ stabil hält, beziehungsweise nur ein langsamer Zellschwund zu verzeichnen ist (Beltrami et al. 2003, Rumyantsev und Borisov 1987). Neben dieser starren Hypothese gibt es zunehmend Nachweise dafür, dass es auch myokardiale Stammzellen gibt (Quaini et al. 2002). Die kardiale Homöostase wird durch Stammzellverbände reguliert, aus denen sich Herzmuskelzellen ebenso wie Koronargefäße bilden können (Anversa et al. 2006). Das Regenerationspotential dieser Zellen zu nutzen, um schädigende Ereignisse (Myokardinfarkte oder Reperfusionsschäden) zu kompensieren, ist Gegenstand aktueller Stammzellforschung.

2002 konnten Strauer et al. erstmals die Effektivität der intrakoronaren Transplantation von autologen mononukleären Knochenmarkzellen zeigen, die möglicherweise Regeneration und Neovaskularisation des Infarktareals bewirken können.

Eine Metaanalyse von sechs durchgeführten klinisch-kontrollierten, randomisierten Kohortenstudien ergab, dass die intramyokardiale Knochenmarktransplantation im Rahmen von aortokoronaren Bypass-Operationen bei Patienten mit chronischer

Herzerkrankung als sicheres Verfahren eingestuft werden kann, das im Vergleich zur alleinigen aortakoronaren Bypass-Operation in definierten Patientenpopulationen eine zusätzliche Verbesserung von Funktionsparametern (Ejektionsfraktion und enddiastolisches Füllungsvolumen des linken Ventrikels) bewirken kann (Donndorf et al. 2011).

Jeevanantham et al. (2012) zeigten ebenfalls im Rahmen einer Metaanalyse von 50 Studien, dass zudem nach intramyokardialer Knochenmarktransplantation die Infarktgröße kleiner war gegenüber der nach gültigem Standard behandelten Patienten und sich in der Langzeitbetrachtung eine reduzierte Mortalität und eine geringere Reinfarktrate in der Interventionsgruppe zeigte.

Ebenso gilt die Kombination von intramyokardialer Knochenmarktransplantation (CD133-positive Zellen) mit Operationen zur Therapie der dilatativen Kardiomyopathie als sicher, jedoch zeigt sich hier eine geringere Verbesserung der linksventrikulären Funktion im Vergleich zu der Kombination mit Bypass-Operationen. Eine verbesserte Durchblutung des Herzmuskels markierte sich hingegen ebenfalls (Nesselmann et al. 2011).

Neben der direkten Applikation von Zellen durch invasive Maßnahmen zeigt sich, dass auch die Ischämie und die damit verbundene Zytokinausschüttung eine Mobilisierung von Progenitorzellen aus dem Knochenmark bewirkt (Takahashi et al. 1999).

Zirkulierende Endothelzellen

Zirkulierende Endothelzellen (CECs) sind im peripheren Blut selten auftretende, nicht-hämatopoetische Zellen, die zu den wenigen Zellpopulationen zählen, die den Oberflächenmarker CD146 (CD für „cluster of differentiation“) tragen. Bei Gesunden finden sich weniger als 10 dieser Zellen je Milliliter Blut (Sack 2007). In Tabelle 2 sind weitere Oberflächenmoleküle hinsichtlich ihres Expressionsmusters auf unterschiedlichen Zelltypen dargestellt. Die Endothelzellen, die die Gefäße auskleiden, tragen demnach die Marker CD31, CD34, CD105 sowie CD133. Für das Molekül CD45 besteht hingegen keine Expression.

Tabelle 2: Übersicht verwendeter CD-Marker, deren charakteristische Expression auf Zellen sowie deren Funktion (Ausschnitt aus Quelle: BD Biosciences 2010)

CD	T-Zelle	B-Zelle	Dendritische Zellen	NK-Zellen	Stammzelle	Makrophage/ Monozyt	Granulozyt	Thrombozyt		Erythrozyt	Endothelzelle	Epithelzelle	Funktion
31	+	+		+		+	+	+		-	+		Zelladhäsion, -aktivierung und -migration
34	-	-	-	-	+	-	-	-		-	+		Zelladhäsion
45	+	+	+	+	+	+	+	-		-	-	-	reguliert T-/ B-Zell -Rezeptor-Signale, Zellwachstum /- differenzierung
105	-	-		-	+	+	-	-		-	+		vermutliche Rolle bei Hämatopoese und Angiogenese
133	-	-	-	-	+	-	-	-		-	+	+	Suppression der Zelldifferenzierung
146	+	-		-		-	-	-		-	+		Zelladhäsion

Endothelzellen lösen sich unter anderem bei Entzündungsreizen oder im Rahmen kardiovaskulärer Erkrankungen und zirkulieren sodann frei im Blut als CECs, woraufhin deren Konzentration über das 10- bis 100-fache ansteigt. Ihr Nutzen wird vor allem in diagnostischer Hinsicht als nicht-invasiver Marker durch ihre Anzeigefunktion für kardiovaskuläre Ereignisse angesehen (Blann et al. 2005). Besonders der enge zeitliche Zusammenhang zwischen Schädigung und Anstieg der CECs wertet diese gegenüber herkömmlichen Markern wie CK-MB oder Troponin T auf (Schmidt et al. 2015).

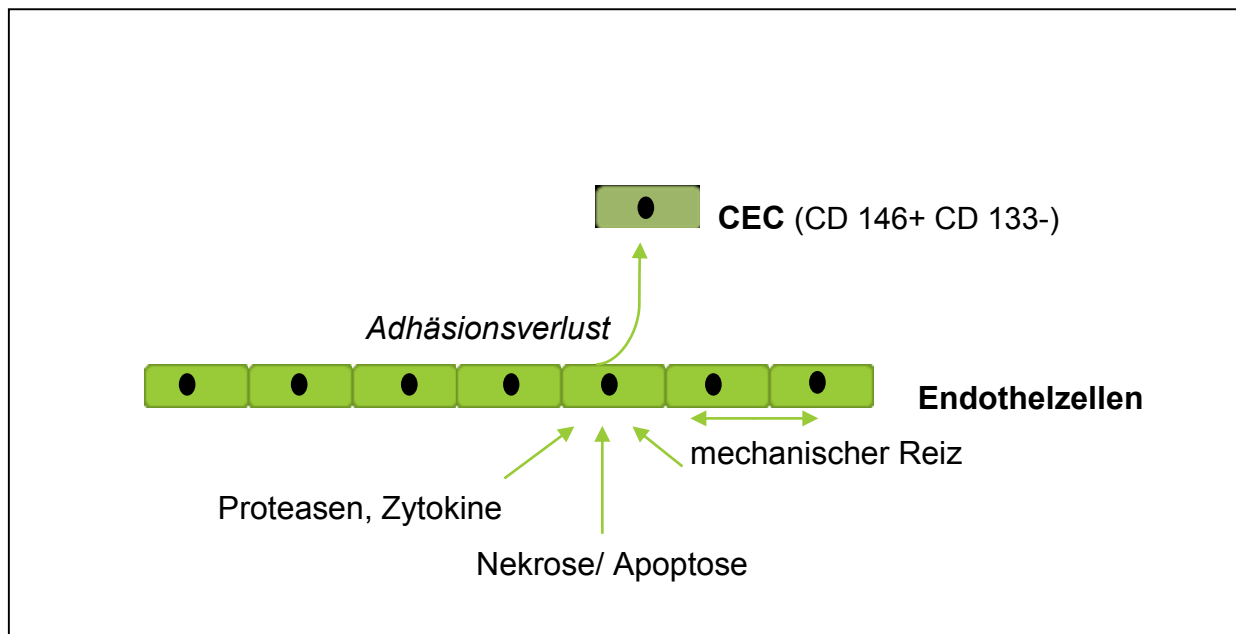


Abbildung 1: Schematische Darstellung zur Stimulierung zirkulierender Endothelzellen (nach Schmidt et al. 2015)

Erfolgt durch mechanische Belastung, durch den Einfluss von Proteasen oder Zytokinen sowie durch Apoptose oder Nekrose der Endothelzellen eine Abschlüpfung, so werden sie als zirkulierende Endothelzellen in die Blutbahn freigesetzt (siehe Abbildung 1). Zirkulierende Endothelzellen sind demnach meist apoptotisch oder nekrotisch im peripheren Blut zu finden (Goon, Patrick K Y et al. 2006). Schmidt et al. (2015) geben einen umfassenden Überblick über Studienergebnisse der CEC-Analyse: Eine Erhöhung dieser Zellpopulation bei stattgefundenem Myokardinfarkt ließ sich abhängig von der Schwere der Schädigung abbilden.

Die präzise Definition dieser Zellen ist jedoch schwer, da die Detektionsmarker in diversen Kombinationen zur Beschreibung zirkulierender, endothelialer Zellen genutzt werden, wobei CD146 als einziger Marker überall akzeptiert wird (Schmidt et al. 2015). In den Arbeiten von Mariucci et al. (2010) wurden die zirkulierenden Endothelzellen weiterhin je nach Expression wie folgt charakterisiert:

reife CEC:	CD45- CD146+ CD34+ CD133-
aktivierte CEC:	CD45- CD146+ CD34+ CD106+
ruhende CEC:	CD45- CD146+ CD34+ CD106-

Im Gegensatz zu zirkulierenden Endothelzellen tragen endotheliale Progenitorzellen (EPC) den Oberflächenmarker CD133. Diese EPCs können laut Rafii et al. (2002) und Mariucci et al. (2010) mittels Durchflusszytometrie mit der typischen Expression von CD45- CD146+ CD34+ CD133+ charakterisiert werden. Die Herkunft der EPCs

sind pluripotente Zellen aus dem Knochenmark. Dies konnte anhand von Untersuchungen an Probanden nach Knochenmarktransplantation, bei denen Spender und Empfänger unterschiedlichen Geschlechts waren, gezeigt werden (Lin et al. 2000). Die zirkulierenden Endothelzellen sind hingegen losgelöste Endothelzellen ohne direkte Herkunft aus dem Knochenmark. So können EPCs im Gegensatz zu CECs kultiviert werden (Goon, Patrick K Y et al. 2006).

1.5 Zytokine

Zytokine sind Polypeptide mit einer Molekülgröße von 15 bis 25 kDa, die über sehr kleine Entfernungen para- oder autokrin wirken.

Ihre Wirkungen weisen eine hohe Diversität auf: Ein auslösender Reiz führt zur raschen Synthese und Ausschüttung aus unterschiedlichen Zelltypen. Über Zytokinrezeptoren vermitteln sie ihre Wirkung auf verschiedene Zelltypen (Pleiotropismus). Unterschiedliche Zytokine können an Zielzellen die gleiche Wirkung vermitteln (Redundanz) und wirken untereinander auf die Synthese anderer Zytokine. Mit Beeinflussung der Genregulation in den Zielzellen können sie sowohl Vermehrung als auch Zelluntergang sowie Differenzierung und Migration herbeiführen.

Eine Einteilung hinsichtlich ihrer unterschiedlichen Funktionen ist sinnvoll und wird in Tabelle 3 verdeutlicht.

Tabelle 3: Übersicht über die Zytokine (Löffler et al. 2007, S. 759, 777ff.)

	<i>Vorwiegend assoziierter Rezeptortyp</i>	<i>Regulation der...</i>	<i>Vertreter</i>
<i>Wachstums- faktoren</i>	Rezeptor-Tyrosinkinasen	Differenzierung von Vorläuferzellen, Zellproliferation	FGF VEGF
<i>Interleukine</i>	Rezeptoren mit assoziierten Tyrosinkinasen	Abwehrreaktionen, Apoptose, Blutbildung, Entzündungsreaktionen	IL-6 TNF GCSF
<i>Interferone</i>		Apoptose, Immunabwehr, Wachstumshemmung	INF- α
<i>Chemokine</i>	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren	Zellmigration	CC-, CXC-, Chemokine

Es gibt sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Zytokine. Zu den pro-inflammatorischen Zytokinen zählen TNF- α , IL-6 und IL-1. Als Prototyp der anti-inflammatorischen Zytokine wird IL-10 betrachtet.

Die Vermittlung von Entzündungsreaktionen dient zum einen als Schutzmechanismus nach einem schädigenden Ereignis, bedingt jedoch auch teils schwerwiegende Folgeschäden, wie beispielsweise einen durch Narbenbildung bedingten Funktionsverlust. Am Herzen bewirken inflammatorische Zytokine linksventrikuläre und endotheliale Dysfunktion, Kardiomyopathie sowie eine Apoptose der Kardiomyozyten (Mann 2013).

Nachdem lange Zeit von einer rein hämodynamischen Ätiologie der Herzinsuffizienz ausgegangen wurde, beschrieben Seta et al. 1996 erstmals die Zytokin-Hypothese: Demnach ist eine Herzinsuffizienz mit einem Anstieg bestimmter Zytokine verbunden. Beim akuten Myokardinfarkt wird die Zytokinausschüttung als körpereigene Antwort auf das Ereignis betrachtet. Neben der Ischämie gelten auch freie Sauerstoffradikale, die in der Reperusionsphase ausgeschüttet werden, als Auslöser der Zytokinseznierung (Gullestad et al. 2012).

Bei Patienten mit fortgeschrittener Herzinsuffizienz fand man höhere Konzentrationen von TNF- α als in einem nicht erkrankten Patientenkollektiv (Torre-Amione et al. 1996; Oral et al. 1995).

Der Zusammenhang zwischen einer exorbitanten Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine und daraus folgender Organschädigung – einschließlich Myokardschäden – konnte häufig gezeigt werden. Wenn es bei Traumapatienten zu einer übermäßigen Ausschüttung von TNF- α , IL-1, IL-6 und IL-8 kommt, ist die Rate unerwünschter kardialer Ereignisse signifikant erhöht und damit einhergehend auch die Mortalitätsrate (De'Ath et al. 2013). Obduktionen an Verstorbenen durch Multiorganversagen zeigten deutliche Erhöhungen der pro-inflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1, IL-6 und IL-8 über den Normwerten (Emura und Usuda 2010). Dass die Dysfunktion des Herzens geringer ist und somit die Kontraktionsfähigkeit erhöht ist, wenn das pro-inflammatorische Zytokin IL-1 β gehemmt wird (durch Caspase 1), zeigten Pomerantz et al. (2001).

Eine Verstärkung der anti-inflammatorischen Zytokine einerseits und die Hemmung der pro-inflammatorischen Zytokine andererseits können die Ausprägung einer Herzinsuffizienz nach einem Infarktgeschehen günstig beeinflussen (Stumpf et al. 2009). Neben den Ansätzen, das Verhältnis der Zytokine zugunsten der anti-

inflammatorischen Zytokine zu verschieben, sind pro-inflammatorische Zytokine, allen voran TNF- α und Zytokine der IL-6-Familie, in der Lage eine kardioprotektive Signalkaskade – den sogenannten SAFE-Mechanismus – auszulösen. SAFE steht für survival activating factor enhancement (Verstärkung von Faktoren, die das Überleben fördern) und beschreibt, dass diese pro-inflammatorischen Zytokine in den Zellen eine intrinsische Aktivierung von Überlebensstrategien auslöst über den Transkriptionsfaktor STAT 3 (signal transducer and activator of transcription 3). Dieser SAFE-Mechanismus kann unter anderem durch Ischämische Konditionierung aktiviert werden (Lecour und James 2011).

IL-8 ist ein Zytokin, das zu einer verstärkten Proliferation von Endothelzellen führt und die Angiogenese mitreguliert (Li et al. 2003). Auf einen Entzündungsreiz (IL-1, TNF- α) wird IL-8 von Phagozyten und mesenchymalen Zellen sezerniert und aktiviert dann neutrophile Granulozyten, welche die weitere Entzündungsreaktion vermitteln. IL-8 vermittelt sowohl chemotaktische als auch inflammatorische Signale (Holmes et al. 1991). Anders als bei Erwachsenen zeigte sich bei Neugeborenen, dass Interleukin 8 von T-Lymphozyten sezerniert wird und hierüber anti-inflammatorische Wirkungen und die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten vermittelt (Gibbons et al. 2014).

Der vaskuläre, endotheliale Wachstumsfaktor VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) reguliert die Gefäßneubildung. Der Hauptfaktor VEGF-A bindet an den beiden Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2, worüber unter anderem die Migration und Vermehrung der Endothelzellen und die vaskuläre Permeabilität reguliert werden (Shibuya 2012; Ferrara et al. 2003). VEGF wirkt additiv bei der Zell-Reprogrammierung, bei der bislang experimentell im Narbenbereich nach einem Herzinfarkt Fibroblasten zu Myokardzellen programmiert werden (Mathison et al. 2012).

VEGF und bFGF wurden bei Versuchen an Mäusen nach Transplantation mesenchymaler Stammzellen ins Herz vermehrt im Myokard nachgewiesen und wirken vor allem parakrin bei der Reparatur der geschädigten Areale mit (Fang et al. 2011).

Von den Fibroblasten-Wachstumsfaktoren FGF (Fibroblast Growth Factors) wurden bislang 23 Typen identifiziert. Endothelzellen sind über spezifische Rezeptoren sensibel für die Ausschüttung von FGF und werden dadurch induziert nach Verletzungen an der Angiogenese mitzuwirken (Oladipupo et al. 2014). Dieser Wachstumsfaktor vermag es eine bereits sehr geringe Anzahl von Endothelzellen zur

Klonierung zu stimulieren und wirkt somit an der Neovaskularisation mit (Gospodarowicz et al. 1976).

FGF-2 (auch bFGF oder basic FGF) wird eine kardioprotektive Funktion zugeschrieben, da er negativ inotrop wirkt (Padua et al. 1998). Intramyokardial verabreichtes FGF-2 führt zu einer geringeren Ausprägung des Reperfusionsschadens, vermittelt über den Rezeptor FGFR1 (Jiang et al. 2002). FGF-2 hat zudem positive Effekte auf die Mobilisierung von hämatopoetischen Stammzellen und Progenitorzellen (Itkin et al. 2012).

Die Mobilisierung von Stammzellen aus dem Knochenmark für die Regeneration von Myokardschäden wird unter anderem auch durch G-CSF (Granulocyte- Colony Stimulating Factor, Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor) verstärkt (Moazzami et al. 2013). So kommt es zu verminderter Apoptose und verbesserter Neovaskularisation des geschädigten Areals (Zhao et al. 2013).

Nach einem Myokardinfarkt werden IL-8, IL-10, VEGF und G-CSF ausgeschüttet, die mit am Heilungsprozess beteiligt sind (Vandervelde et al. 2005). VEGF und IL-8 sind zudem an der Kardiogenese und Neoangiogenese beteiligt. Zytokine spielen somit eine sehr bedeutende Rolle in der Stammzellmobilisierung und Regeneration von geschädigtem Myokard (Vandervelde et al. 2005).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die thematische Hinführung zeigt, dass Untersuchungen zu Verwendung und Wirkungsweise der Stammzelltherapie einen aktuellen und erfolgversprechenden Forschungsschwerpunkt bei kardiovaskulären Erkrankungen sowie zur Minderung des Reperfusionsschadens darstellen. Neben dem direkten Einbringen von Stammzellen ins Gewebe gilt es die Wirksamkeit von Verfahren zur Stammzellmobilisierung zu untersuchen, da dies weniger invasiv ist. Die Ischämische Fernkonditionierung gilt dabei in aktuellen Untersuchungen als eine nicht-invasive Maßnahme zur Verbesserung des klinischen Outcome von Patienten, die einer therapieassoziierten Organischämie unterzogen werden. Die Multicenterstudie „RIPHeart“ untersucht den Einfluss der Ischämischen Fernkonditionierung als klinisch- kontrollierte, randomisierte Doppelblindstudie und sammelt hierzu die Verläufe von Patienten nach kardiochirurgischem Eingriff an der Herz-Lungen-Maschine anhand klinischer und laborparametrischer Daten.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen Ergebnisse zum Einfluss der Ischämischen Fernkonditionierung auf zirkulierende endotheliale Stamm-/Progenitorzellen, zirkulierende Endothelzellen und die Ausschüttung von Zytokinen mit direkter oder indirekter Wirkung auf (Stamm-) Zellrekrutierung sowie Angiogenese im peripheren Blut zusammengetragen werden. Die peripheren Blutentnahmen erfolgen präoperativ sowie 6 und 48 Stunden nach Ende der Operation und zum Zeitpunkt der Entlassung des Patienten aus dem Krankenhaus.

Die hierzu in der Durchflusszytometrie detektierten, zellulären Oberflächenmarker sind CD31, CD34, CD45, CD105, CD133 und CD146. Zirkulierende Endothelzellen gehören zu den wenigen CD146 exprimierenden Zellen. Endotheliale Progenitorzellen tragen das CD-Molekül 133.

Die Konzentrationen der Zytokine bFGF, VEGF, G-CSF, TNF, IL-1 β , IL-6, IL-8 und IL-10 werden ebenfalls hinsichtlich zeitlicher Entwicklung und Ausmaß der Einflussnahme der Behandlung untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Studienpopulation

Im Rahmen der Multicenter-Studie „Remote Ischaemic Preconditioning for Heart Surgery“ (RIPHeart-Study; ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01067703) wurde ein Rostocker Patientenkollektiv durch Fachärzte für Anästhesie und Intensivmedizin des Universitätsklinikums Rostock rekrutiert. Es wurden Patienten in die Studie eingeschlossen, die älter als 18 Jahre alt waren und die nach Aufklärung durch einen Arzt oder eine Ärztin schriftlich einwilligten, sich einem elektiven herzchirurgischen Eingriff an der Herz-Lungen-Maschine zu unterziehen. Nach dem Vorbild des „informed consent“ (wörtlich: Einverständniserklärung) der „Declaration of Helsinki“ (World Medical Association 2013) wurden einwilligungsfähige Patienten zunächst hinreichend über die Teilnahme an der Studie informiert und danach deren Einverständnis eingeholt. Bei den kardiochirurgischen Eingriffen handelte es sich um aortokoronare Bypass-Operationen, Aortenklappenersatz, Mitralklappenersatz, Mitralklappenrekonstruktion, Aorta ascendens-Ersatz oder Kombinationseingriffe.

Die Ausschlusskriterien wurden in vier Kategorien eingeteilt (vgl. Tabelle 4). Das Zutreffen eines dieser Kriterien führte automatisch zum Ausschluss des Patienten aus der Studie.

Tabelle 4: Ausschlusskriterien der RIPHeart-Studie

<i>Ausschluss- kriterien bezüglich der kardialen Anamnese</i>	<ul style="list-style-type: none">• schwere linksventrikuläre Funktionsstörung (Ejektionsfraktion \leq 30% in Koronarangiografie und/ oder Echokardiografie)• chronisches Vorhofflimmern• intermittierendes Vorhofflimmern in den letzten sechs Monaten präoperativ• Einnahme folgender Medikamente: Digitalis-Präparate, Amiodaron und/oder Antiarrhythmika der Klasse I• implantierter Herzschrittmacher oder Defibrillator• Myokardinfarkt in den letzten sieben Tagen präoperativ• instabile Angina pectoris innerhalb der letzten 24 Stunden präoperativ mit Troponin-T-Anstieg
---	---

<i>Ausschluss- kriterien bezüglich des Eingriffs</i>	<ul style="list-style-type: none"> • off-pump-Verfahren • minimal-invasive Eingriffe über laterale Thorakotomie • Aorta descendens-Ersatz • gleichzeitige Carotis-Thrombendarteriektomie • selektive antegrade Hirnperfusion während des Herz-Lungen-Maschinen- Stillstands • Voroperationen an Herz/ Aorta
<i>Ausschluss- kriterien bezüglich weiterer Begleit- erkrankungen</i>	<ul style="list-style-type: none"> • schwere Niereninsuffizienz (Kreatinin im Serum >2,0 mg/dl) • schwere Leberinsuffizienz (spontan International Normalized Ratio >1,8 und/oder Bilirubin im Serum > 8,8 mg/dl und/ oder nach fachärztlicher Einschätzung) • schwere Lungenerkrankung (partielle Sauerstoffsättigung < 85% bei Raumluft und/ oder forciertes expiratorisches Volumen (FeV1) ≤ 50% und/oder nach fachärztlicher Einschätzung) • schwerer Alkoholabusus • Schlaganfall (< 2 Monate) • einen Wert größer als zwei auf der NIH-Stroke-Scale • schwere neurologische Erkrankungen (Morbus Parkinson, Multiple Sklerose, Morbus Alzheimer, präoperatives Delir oder weitere durch fachärztliche Einschätzung) • akute Infektionen unter Antibiotikatherapie (< 7 Tage) • Einnahme von Sulfonylharnstoffen und Nicorandil (< 24 Stunden) • periphere arterielle Verschlusskrankheit im Stadium IV • Heparin-induzierte Thrombozytopenie
<i>Weitere Ausschluss- kriterien</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Teilnahme an anderen klinischen Prüfungen (< 30 Tage) • infauste Prognose aufgrund einer anderen Erkrankung • weitergehende Beziehungen zum Prüfer • Frauen während Schwangerschaft und Stillzeit • Sprach- und Verständigungsprobleme während der Aufklärung • mangelnde Kooperationsbereitschaft

2.2 Zeitlicher Ablauf der Probenentnahme

Die Entnahme der peripheren Blutproben geschah zu vier Zeitpunkten durch medizinisches Fachpersonal der Universitätsmedizin Rostock. Die Zeitpunkte wurden mit T0 bis T3 bezeichnet und zu den in Tabelle 5 dargestellten Zeiten entnommen.

Tabelle 5: Zeitpunkte der Probenentnahme

<i>Bezeichnung</i>	<i>Zeitwertbeschreibung</i>
T0	<ul style="list-style-type: none">• Präoperativer Referenzwert
T1	<ul style="list-style-type: none">• 6 Stunden nach Operationsende
T2	<ul style="list-style-type: none">• 48 Stunden nach Operationsende
T3	<ul style="list-style-type: none">• Entlassungswert: 7-10 Tage postoperativ

Neben der direkt angeschlossenen Bearbeitung der Proben zur Isolierung peripherer mononukleärer Zellen als Vorbereitung für die Durchflusszytometrie wurden Teilproben eingelagert, die zu einem späteren Zeitpunkt für die Zytokinanalyse verwendet wurden. Hierzu wurden jeweils etwa 2 ml EDTA- und Lithium-Heparin-Blut sowie Serum in kleine Röhrchen (Eppendorf AG, Deutschland) gefüllt und bei -80°C aufbewahrt.

2.3 Labortechnische Methoden

2.3.1 Isolierung peripherer mononukleärer Zellen aus menschlichem Blut

Um mononukleäre Zellen zu isolieren, wird das Auftrennen durch Zentrifugation mit Hilfe des Dichtegradientenmediums Leucocyte Separation Medium (LSM) (PAA Laboratories GmbH, Deutschland) in Leucosep™-Tubes (Greiner Bio-One, Deutschland) angewandt, da dieses Verfahren das Trennen der Lymphozyten und mononukleären Zellen von Erythrozyten und Granulozyten ermöglicht (greiner bio-one). Für die Isolierung der peripheren mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut wurden zunächst zwei 50-ml-Leucosep™-Tubes bis zur 32,5 ml-Markierung mit LSM (PAA Laboratories GmbH, Deutschland) befüllt und anschließend herunterzentrifugiert, sodass nach Abnahme des Überstands das Röhrchen im unteren Teil mit LSM gefüllt war und nach oben mit dem Filter abgeschlossen wurde. Darauf wurde das Blut gegeben, welches zuvor in ein 50-ml-Gefäß überführt, volumetrisch erfasst und nach zwei Waschschritten mit 2 mM-EDTA-Puffer bis zur 50-ml-Markierung mit eben diesem 2 mM-EDTA-Puffer aufgefüllt wurde. Daraufhin

wurden langsam je 25 ml des EDTA-gepufferten Bluts in zwei Leucosep™-Röhrchen überführt, welche dann bei 400 G für 40 Minuten in der Multifuge 1S-R (Heraeus, Deutschland) zentrifugiert wurden.

Die Zentrifuge wurde auf langsame Beschleunigung (Stufe 3) und ungebremste Entschleunigung (Stufe 1) eingestellt. Danach befanden sich Erythrozyten und Granulozyten unterhalb des Filters getrennt von der Schicht darüber liegender mononukleärer Zellen und Lymphozyten mit einem Serumüberstand.

Der Überstand wurde entnommen und verworfen. Die Zelllage wurde anschließend vorsichtig in ein frisches 50-ml-Gefäß mit 35 ml 2 mM-EDTA-Puffer überführt. Dieses Gefäß wurde wiederum bei 300 G für 10 Minuten zentrifugiert.

Das so entstandene Pellet wurde nach Abnahme des Überstandes in 0,5 ml steriles PBS (PAN Biotech GmbH, Deutschland) suspendiert.

Abschließend wurde mit Methylenblau/Essigsäure eine Auflösung der Plasmamembran und das Anfärben der Zellkerne erreicht, sodass die kernhaltigen Zellen in einer Neubauer-Zählkammer numerisch erfasst werden konnten, um die Volumina für die weiteren Versuche errechnen zu können.

2.3.2 FACS-Analyse/ Durchflusszytometrie

Durchflusszytometrie ist ein sensitives Verfahren um simultane Oberflächenmolekülexpression zu zeigen. Dies wurde hier genutzt um zirkulierende Endothelzellen anhand ihrer Koexpression von Markern qualitativ und quantitativ zu erfassen. Hierzu wurden die Oberflächenmoleküle mit an Antikörpern gebundenen Fluorochromen markiert und anschließend am Durchflusszytometer detektiert.

Für die Analyse der zirkulierenden Endothelzellen wurden folgende Antikörper benutzt (vgl. Tabelle 6):

Tabelle 6: Verwendete Antikörper für Durchflusszytometrie

Antikörper	Fluoreszenzfarbstoff	Hersteller	Katalognummer
CD105	Alexa647 (APC)	Serotec	MCA15557A647
CD34	PE-Cy7	Miltenyi Biotec	130-081-002
CD133	PE	Miltenyi Biotec	130-090-085
CD146	Biotin	Miltenyi Biotec	130-092-852
Streptavidin	PerCP-Cy5.5	BD Biosciences	551419
CD31	FITC	BD Biosciences	555445
CD45	AM Cyan (V500)	BD Biosciences	560777
NearIR Live Dead Stain	APC-Cy7	Life Technologies	L10119

Während der Fluoreszenzmarkierung wurde auf Eis gearbeitet und stets gekühltes PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung) benutzt. Da zunächst CD146-Biotin an Streptavidin-PerCy5.5 gebunden und dafür 30 Minuten inkubiert werden musste, wurde diese Verbindung entsprechend vorbereitet.

In 1,5 ml-Eppendorf®-Röhrchen wurden je $0,5 \times 10^6$ Zellen für die Einzelfärbungen und je 1×10^6 Zellen für die Mehrfachfärbungen pipettiert. Anschließend wurde die errechnete Menge MACS-Puffer (Miltenyi Biotech, Deutschland) und schließlich je 10 µl FcR-Blocker-Reagenz (Miltenyi Biotech, Deutschland) hinzugefügt. Die an Fluoreszenzfarbstoffe gebundenen Antikörper wurden an die Ränder der Röhrchen pipettiert, um möglichst zu gleicher Zeit mittels schneller Bewegung Zellen und Antikörper zueinander zu bringen. Nach kurzer Zentrifugation folgte ein Inkubationsschritt für 30 Minuten bei 4°C.

Anschließend wurde je 1 ml PBS hinzugegeben und bei 300 G und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert (Biofuge primo R, Heraeus).

Der entstandene Überstand über dem Pellet wurde entnommen und verworfen. Das Pellet wurde in 150 µl PBS resuspendiert.

Zur Fixierung der Proben wurden 100 µl Paraformaldehyd/PBS (4%) und 15 µl 1% iger Natriumazidlösung hinzugegeben und die Proben bei 4°C aufbewahrt.

Die durchflusszytometrische Messung am BD LSR II (BD Biosciences, IC-Nr. 37418, Seriennummer H47600128) erfolgte innerhalb von sieben Tagen.

Mit Hilfe der BD FACSDiva™ software (BD Biosciences, Deutschland) wurden neben PC-assistierter Kompensation für jede mehrfachgefärbte Probe manuell die Gates,

also diejenigen Bereiche, die die zu untersuchenden Zellpopulationen definieren, entsprechend zuvor gemessener Einzelfärbungen gesetzt. Zudem wurde die FMO-Methode („fluorescence minus one“) genutzt, bei der alle gemessenen Reagenzien abzüglich einer einzelnen untersucht werden (Roederer 2001).

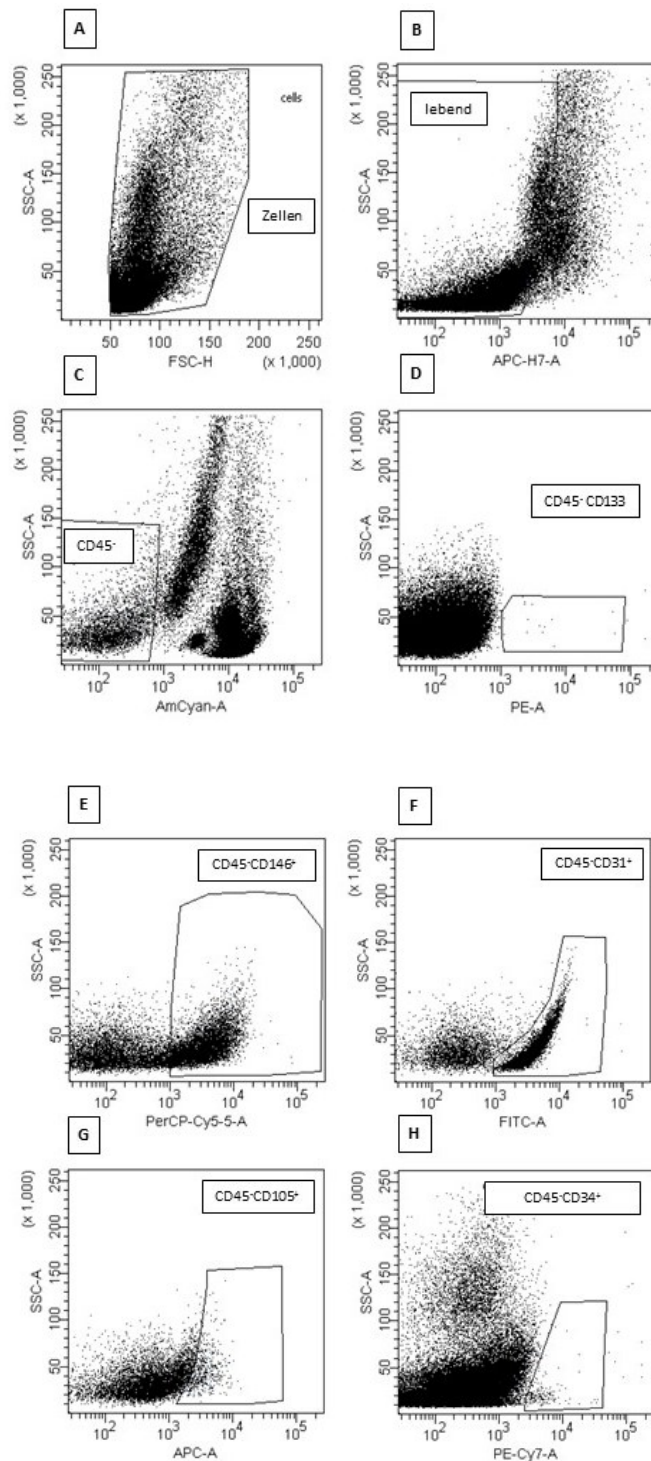


Abbildung 2: Gating-Strategie für CEC-Zellen

Abbildung 2 veranschaulicht wie zunächst anhand von Größe und Granularität Debris (Zelltrümmer) ausgeschlossen wurde (A). Danach wurden vitale Zellen ausgewählt (B). Mittels Boolean-Gating-Strategie wurden Leukozyten ausgeschlossen (C) und auf Basis der CD45-negativen Zellen wurde die Expression von Endothelmarkern analysiert (CD133 (D), CD146 (E), CD31 (F), und CD34 (H)). Die Mehrfachexpression dieser Marker wurde dabei durch logische Kombination einzelner Gates abgebildet. Lebende CD45-negative Zellen, die alle untersuchten Endothelmarker exprimieren (CD45- CD34+ CD146+ CD31+ CD105+) wurden als „CEC“ bezeichnet.

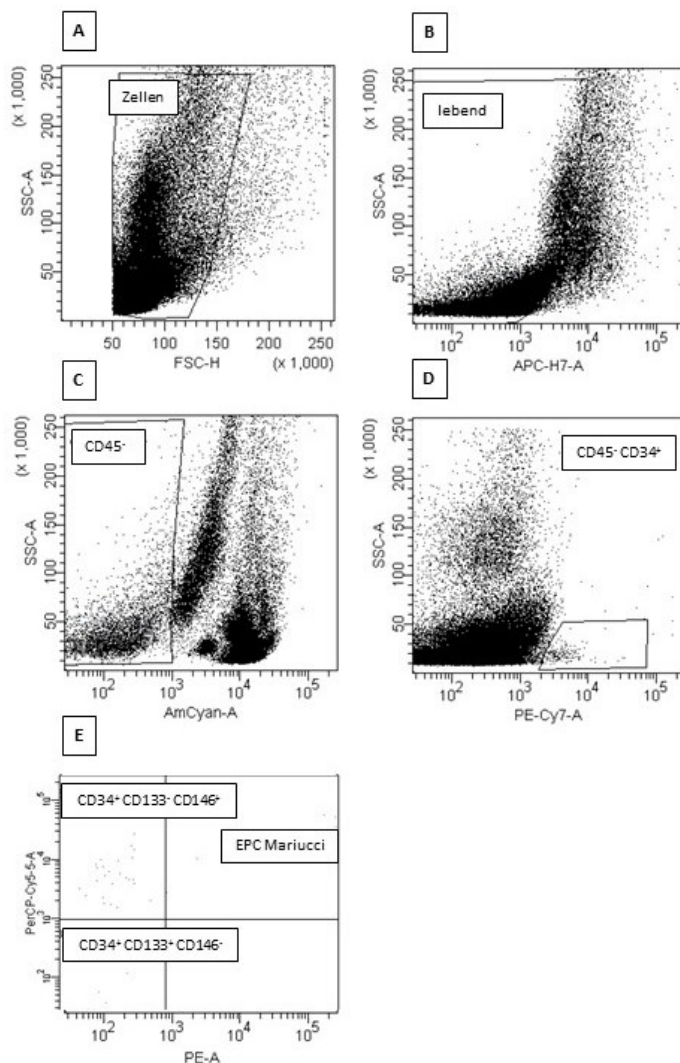


Abbildung 3: Gating-Strategie für zirkulierende Endothelzellen und zirkulierende endotheliale Progenitorzellen nach Mariucci et al. (2010)

Abbildung 3 zeigt, dass für die Beurteilung der zirkulierenden Endothelzellen und zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen nach Mariucci et al. (2010) wurde

zunächst anhand von Größe und Granularität Debris ausgeschlossen (A) und dann vitale Zellen ausgewählt (B). In einer Boolean-Gating-Strategie wurden Leukozyten ausgeschlossen (C), daraufhin aus den CD45-negativen Zellen die CD34-positiven Zellen ausgewählt (D) und anhand ihrer Expression von CD133 und CD146 in Quadranten eingeteilt (E). Lebende CD45- CD34+ CD133+ CD146+ Zellen können dabei als nach Mariucci et al. (2010) als endotheliale Progenitorzellen und lebende CD45- CD146+ CD34+ CD133- Zellen als reife zirkulierende Endothelzellen bezeichnet werden.

2.3.3 Zytokinanalyse

Die Durchführung der Analyse erfolgte entsprechend der Anleitungen der Firma BD Biosciences (Deutschland), womit eine quantitative Erfassung der Zytokine aus Plasma mittels Durchflusszytometrie möglich ist.

Zur Untersuchung der humanen Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 und TNF wurde das „BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Inflammatory Cytokines Kit“ (BD Biosciences, Deutschland) verwendet.

Das „BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Soluble Protein Master Buffer Kit“ (BD Biosciences, Deutschland) wurde mit den entsprechenden „BD CBA Flex Set Assays“ (BD Biosciences, Deutschland) für die Erfassung von enthaltenem bFGF, G-CSF und VEGF genutzt.

Die verwendeten „Capture Beads“ entsprechen kugelförmigen Molekülen, an deren Oberfläche für je ein Analyt spezifische Antikörper sitzen, um die zumeist geringe Zahl der zu untersuchenden Analyte möglichst gut „abfangen“ zu können. Die Größe und Fluoreszenz der Capture Beads, sowie deren Spezifität zu den Zytokinen sind bekannt. Dadurch können die Zytokine später in der Durchflusszytometrie unterschieden werden. Das Verfahren der Cytometric Bead Arrays (CBA) basiert darauf, dass die zu analysierenden Zytokine einerseits an Capture Beads über spezifische Antikörper und andererseits an Detektorantikörper (an Phycoerythrin (PE) als Detektionsreagenz gebundene Antikörper) gebunden werden. Die so entstandenen „Sandwiches“ werden in der Durchflusszytometrie detektiert und je nach Intensität der PE-Fluoreszenz können Rückschlüsse auf die vorliegenden Konzentrationen gezogen werden (vgl. Abbildung 4).

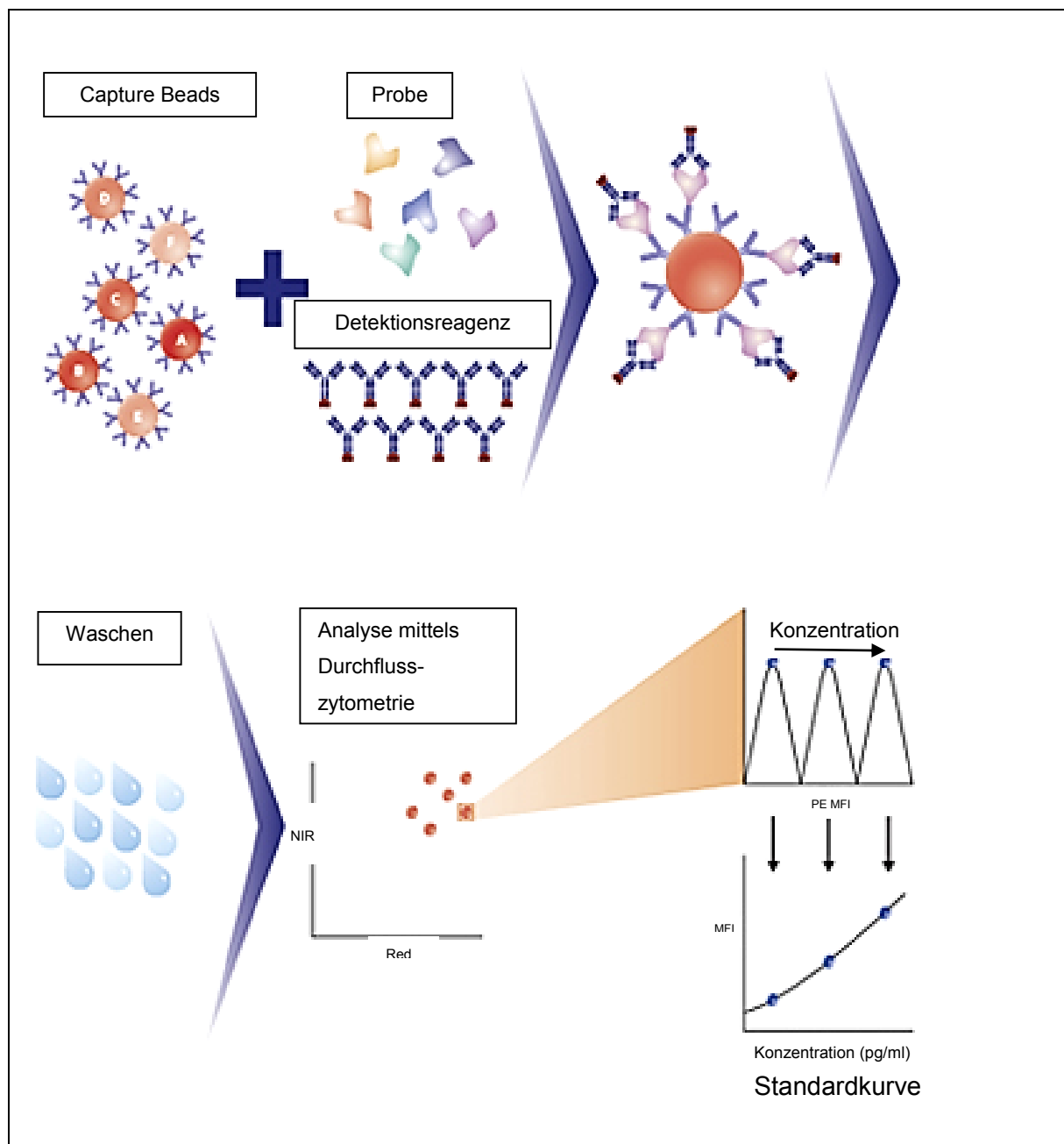


Abbildung 4: Prinzip der "CBA" (nach BD Biosciences- Assay Principle 2013)

Neben dem Ansetzen und Messen der Serumproben werden in gesonderten Gefäßen ebenfalls die Capture Beads und Detektionsantikörper an mitgelieferte rekombinante Standards in einer Verdünnungsreihe gebunden und gemessen. So entsteht für jedes Analyt eine entsprechende Standardkurve.

Die Serumproben wurden für die Zytokinanalyse auf Raumtemperatur gebracht und dann entsprechend des Versuchsaufbaus weiterbearbeitet.

Als Vorbereitung wurden zunächst die Standards angesetzt, die Capture Beads gemischt sowie die Serumproben entsprechend der Anweisung 1:4 mit Probenverdünnungsmittel („Assay diluent“) verdünnt.

Das Vorbereiten der Standards erfolgte zunächst in 15-ml-Polypropylen-Gefäßen. Vom „Topstandard“ wurde eine Verdünnungsreihe mit Assay diluent bis hin zu einer Konzentration von 1: 256 angefertigt.

Die Capture Beads wurden entsprechend der Anweisung gemischt, zentrifugiert (Biofuge primo R, Heraeus, Deutschland) und nach Entnahme und Verwerfen des Überstandes in Serum Enhancement Buffer resuspendiert.

Die verdünnten Serumproben und die Verdünnungsreihe der Standards wurden in dafür vorgesehene und beschriftete 1,5 ml-Eppendorf-Röhrchen gegeben. Die Capture Beads wurden in jedes der Röhrchen verteilt. Daraufhin schlossen sich je nach Kit unterschiedlich lange Inkubationszeiten und Waschschrte an, außerdem wurde das PE-Detektionsreagenz hinzugegeben. Die Vorgehensweise in beiden Tests soll die Abbildung 5 verdeutlichen.

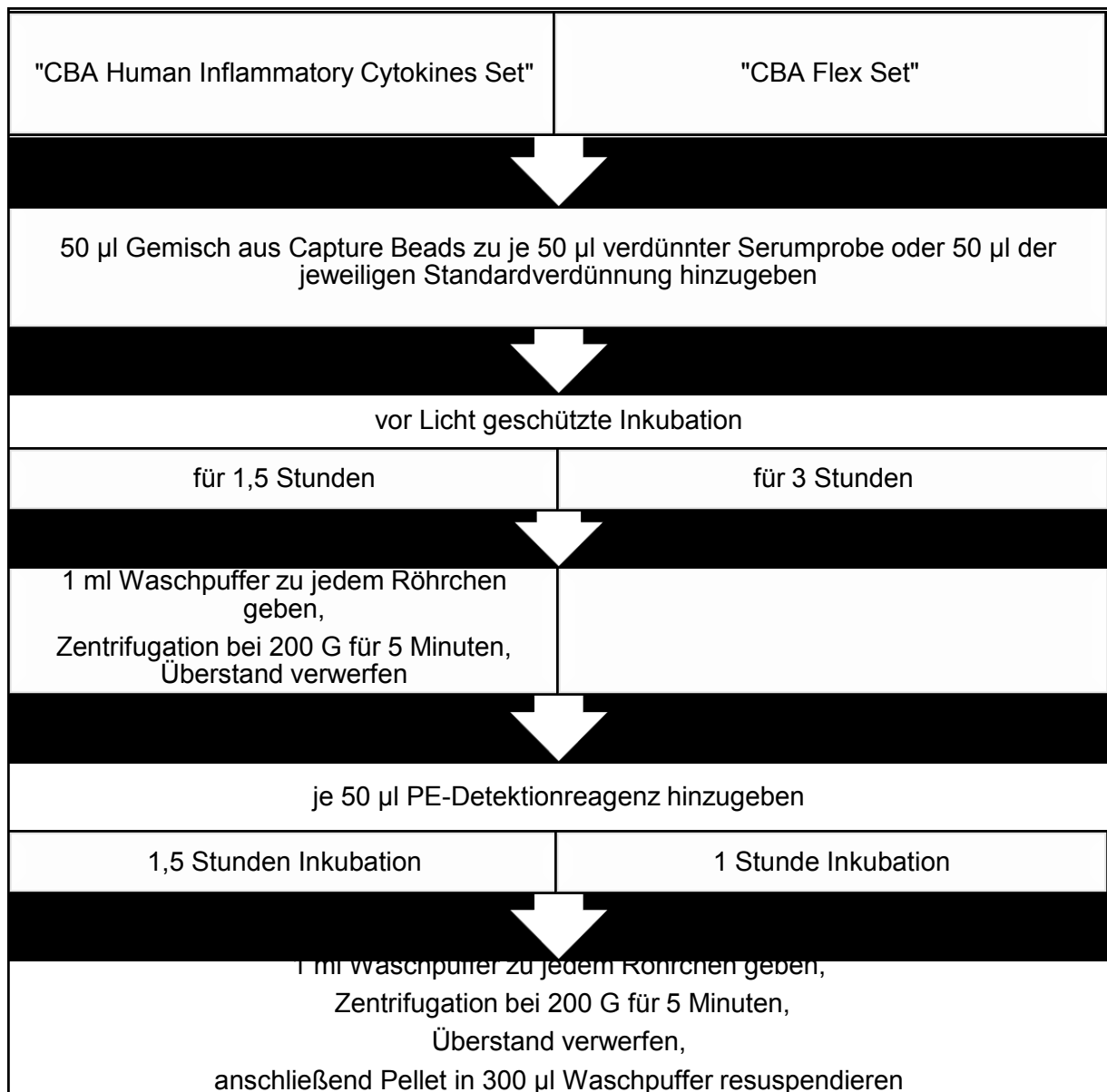


Abbildung 5: Ablauf der CBA

Die Analyse wurde am Durchflusszytometer BD LSR II (BD Biosciences, IC-Nr. 37418, Seriennummer H47600128) durchgeführt.

Die Auswertung der Daten erfolgte mittels BD FACSDiva™software (BD Biosciences, Deutschland) und anschließend FCAP Array™software 3.0 (BD Biosciences, Deutschland).

2.4 Statistische Auswertung

Zur statistischen Datenauswertung wurde das Statistikprogramms IBM Statistics SPSS Version 20 genutzt.

Zunächst wurde die deskriptive Statistik der Häufigkeiten durchgeführt.

Die Daten wurden hinsichtlich ihrer Normalverteilung nach Kolmogorov-Smirnov-Lillifors und Shapiro-Wilk für Stichproben mit $n < 50$ untersucht.

Für die schließende Statistik wurde zunächst der U-Test nach Mann und Whitney angewandt. Dieser dient als parameterfreies Verfahren für zwei unabhängige Stichproben dazu Behandlungs- und Kontrollgruppe zu einzelnen Zeitpunkten zu vergleichen.

Die Analyse beider Gruppen über den zeitlichen Verlauf hinweg wurde mittels Varianzanalyse mit Messwiederholung (repANOVA= ANalysis Of VAriance with repeated measurement) berechnet. Diese Art von Mittelwertvergleich erlaubt zum einen Aussagen darüber, ob sich zwischen beiden Gruppen ein signifikanter Unterschied über die Zeit hinweg zeigt (Innersubjekteffekt Zeit*FallKontroll) und zum anderen, ob sich die beiden Gruppen zeitunabhängig voneinander unterscheiden (Zwischensubjekteffekt).

Um eine Signifikanz im zeitlichen Verlauf unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit zu betrachten, wurde der Innersubjekteffekt Zeit mittels repANOVA verwendet.

Die Innersubjektkontraste erlaubten einen Vergleich zwischen zwei definierten Zeitpunkten sowohl gruppenab- als auch gruppenunabhängig. Die Ausgabe der Grafiken mit dem Verlauf der Mittelwerte der beiden Gruppen zusammen mit den errechneten Effekten und Kontrasten ermöglichte eine gute Abbildung der zeitlichen Entwicklung der einzelnen zu analysierenden Zellpopulationen oder Zytokinkonzentrationen.

Bestand zum Referenzzeitpunkt T0 bereits ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen war es nötig auf diesen Zeitpunkt beziehende Änderungen zu berechnen.

Es erfolgte die Berechnung absoluter Änderung, nach folgender Gleichung:

$$\text{absolute Änderung Tx zu T0} = Tx - T0$$

Die Berechnung relativer Änderung nach folgender Gleichung bietet eine bessere Vergleichbarkeit:

$$\text{relative Änderung Tx zu T0 (\%)} = \frac{Tx - T0}{T0} \times 100$$

Kamen Messwerte mit Null vor, so musste die absolute Änderung miteinbezogen werden, da Division durch Null nicht definiert ist, anderenfalls erfolgte die Berechnung relativer Änderung.

3 Resultate

3.1 Zytokinanalyse

3.1.1 Deskriptive Statistik

3.1.1.1 Altersverteilung

Für die Zytokinanalyse umfasste die Untersuchungss Stichprobe 46 Patienten. Der jüngste Proband war zum Zeitpunkt der Operation 26 Jahre alt, der älteste Patient 82 Jahre alt. Daraus resultiert eine Spannweite von 56 Jahren, bei einem Mittelwert von 64,74 Jahren mit einer Standardabweichung von 10,9 Jahren.

Nach Einteilung der Patienten in 6 Altersgruppen ergibt sich die in Abbildung 6 gezeigte Altersstruktur des Patientenkollektivs.

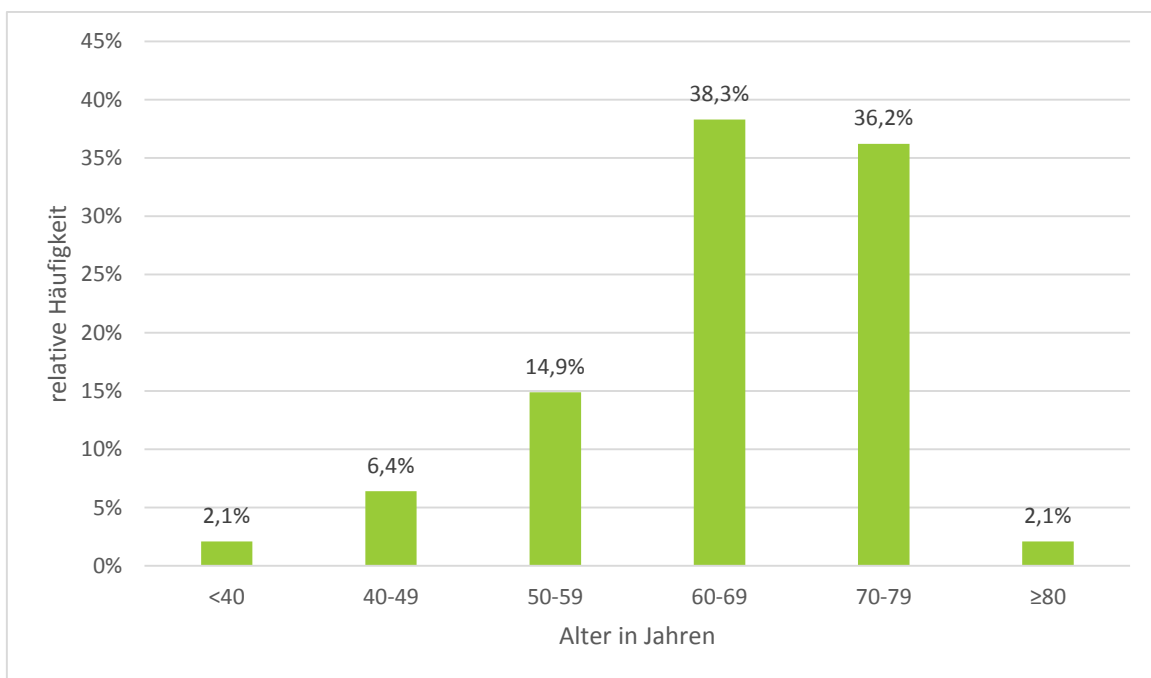


Abbildung 6: Gruppierte Altersverteilung der Zytokinanalyse

Das Durchschnittsalter weiblicher Patienten betrug 68,2 Jahre, das der männlichen Patienten 64,2 Jahre.

3.1.1.2 Geschlechterverteilung

Die Stichprobe setzte sich aus 35 Männern (76,1%) und 11 Frauen (23,9%) zusammen, wie Abbildung 7 zeigt.

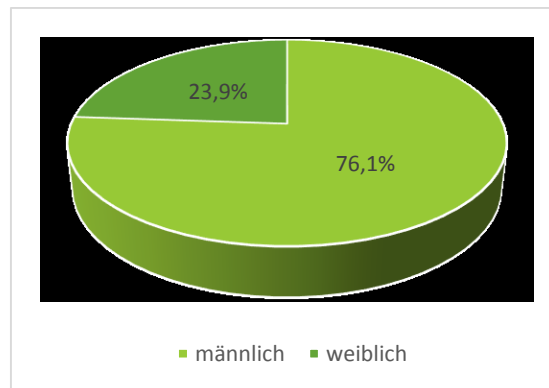


Abbildung 7: Geschlechterverteilung

3.1.1.3 Art der Operation

Im Rahmen der Studie wurden verschiedene operative Eingriffe durchgeführt:

- Aortokoronare Bypass-Operationen
- Aortenklappenersatz und -rekonstruktion
- Mitralklappenersatz und -rekonstruktion
- Doppelklappenersatz
- Aorta-ascendens-Ersatz
- OP nach DAVID
- Tumorexstirpationen
- Myektomie nach MORROW
- Bio-Bentall

Diese können in drei Kategorien unterteilt werden:

1. Reine Bypass-Operationen (ACB)
 2. Kombinationseingriffe mit Bypass-Operation (ACB)
- und
3. Kardiochirurgische Eingriffe ohne Bypass-Operation (ACB)
 - 4.

Mit insgesamt 50% nahmen reine ACB-Operationen den größten Teil an Operationen ein. Kardiochirurgische Operationen, die mit Bypass-Eingriff kombiniert waren, machten 21,7% und solche ohne Bypass-Anteil 28,3% aus.

Abbildung 8 verdeutlicht die Zusammensetzung der Arten von Operationen in der Kontroll- und Interventionsgruppe.

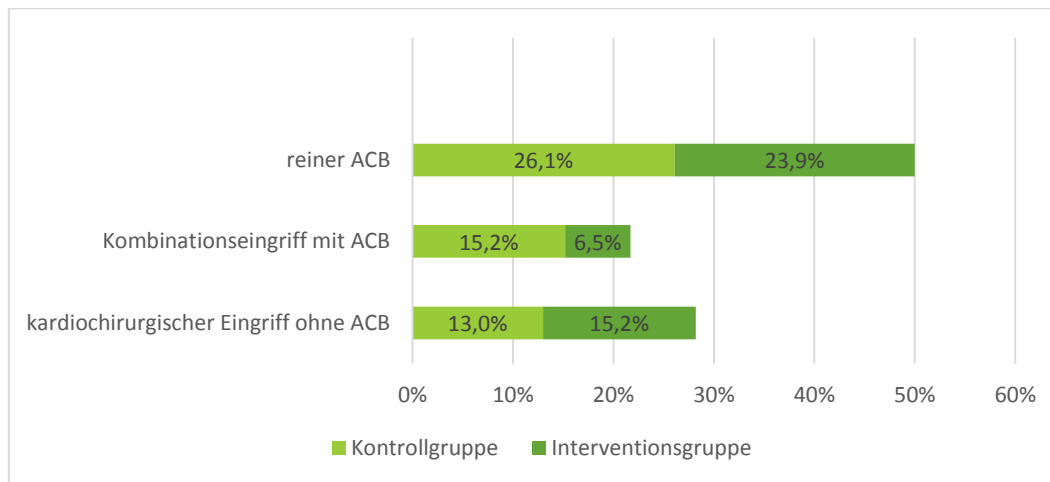


Abbildung 8: Verteilung der Operationsarten in Interventions- und Kontrollgruppe

3.1.1.4 Präoperative Ejektionsfraktion

Vor der Operation wurde bei 39 von 46 Patienten die Ejektionsfraktion mittels Echokardiografie numerisch bestimmt und archiviert. Gemessen wurden ein minimaler Wert von 35% und ein maximaler Wert von 82% für die Auswurffraktion. Der Mittelwert der Ejektionsfraktion betrug 59,11%. Da von drei weiteren Patienten die Bezeichnung „normwertig“ für die Ejektionsfraktion notiert wurde (ohne numerische Angabe) und diese kategorial mit eingeordnet werden konnte, ergab sich nach Aufteilung der Ejektionsfraktion in vier Kategorien (nach Lang et al. 2005) folgende Häufigkeitsverteilung auf das untersuchte Kollektiv:

Tabelle 7: Absolute und Relative Häufigkeit der kategorial eingeordneten Ejektionsfraktionen

	Ejektionsfraktion	Absolute Häufigkeit (n=46)	Relative Häufigkeit
<i>Normal</i>	≥55%	33	71,7%
<i>Leichtgradig eingeschränkt</i>	45-54%	8	17,4%
<i>Mittelgradig eingeschränkt</i>	30-44%	1	2,2%
<i>Hochgradig eingeschränkt</i>	<30%	0	0,0%
fehlende Angabe		4	8,7%

Zu 71,1% ergaben sich präoperativ normwertige Ejektionsfraktionen, kein Patient hatte eine hochgradig eingeschränkte Ejektionsfraktion. Bei 17,4% der Patienten konnte eine Ejektionsfraktion von 45-54% ermittelt werden, was einer leichtgradigen Einschränkung entspricht. Nur ein Patient hatte eine mittelgradig eingeschränkte Ejektionsfraktion.

Bei 8,7% der Patienten wurden keine Werte angegeben (Vgl. Tabelle 7).

3.1.1.5 Tageszeit der Operation

Von 46 Patienten wurde in 35 Fällen (76,1%) die Operation morgens durchgeführt. Bei 11 Patienten (23,9%) war der Eingriff die zweite im Operationssaal durchgeführte Operation und begann somit etwa um 12 Uhr.

3.1.2 TNF

Die Werte der Analyse für TNF unterlagen keiner Normalverteilung.

Die Mittelwerte der Gruppen zeigten in der Untersuchung der einzelnen Zeitpunkte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (T0:p=.864, T1:p=.296, T2:p=.296, T3:p=.446).

Die Varianzanalyse mit Messwiederholung ergab sowohl für die reinen Messwerte als auch für die berechneten absoluten Änderungen zu T0 keine signifikanten Inner- und Zwischensubjekteffekte.

Die Innersubjektkontraste für den zeitlichen Verlauf, abhängig von der Gruppenzugehörigkeit, zeigten für die Entwicklung von T0 zu T1 und von T0 zu T2 signifikante Unterschiede.

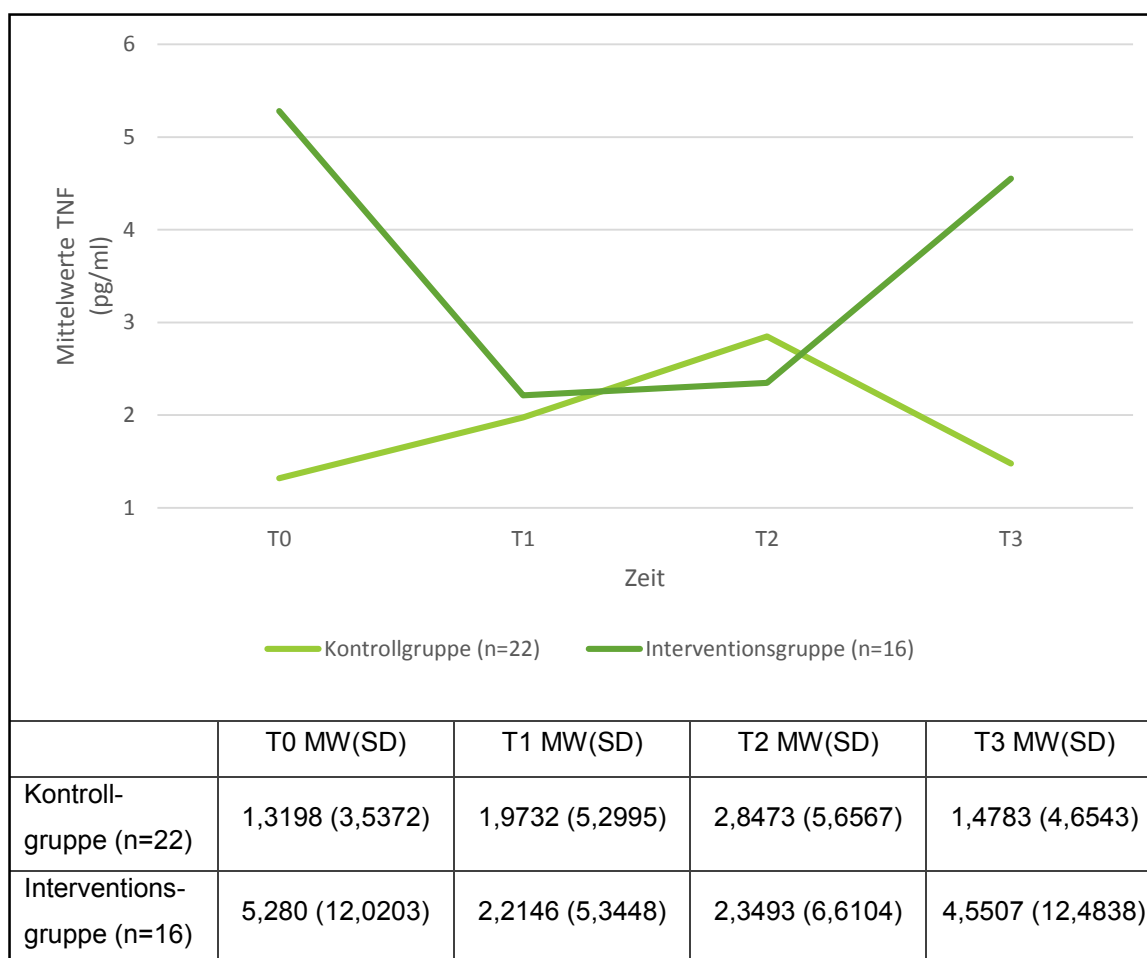


Abbildung 9: Zeitlicher Mittelwertverlauf von TNF in Interventions- und Kontrollgruppe

Die Abbildung 9 veranschaulicht den Abfall der TNF-Konzentration bei den mit Ischämischer Präkonditionierung behandelten Patienten nach T0. In der Kontrollgruppe hingegen stiegen die TNF-Konzentrationen vom präoperativen Wert an. Der Innersubjektkontrast zwischen T1 und T2 zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen und über die Zeit, wodurch der nahezu parallele Verlauf beider Gruppen zu erklären ist. Zwar visualisiert die Grafik divergente Verläufe der beiden Gruppen nach T2, der abgebildete Trend ist jedoch nicht signifikant ($p=.134$).

Bei Betrachtung des Kollektivs ($n=8$), das mit einem Wert ungleich 0 pg/ml zum präoperativen Zeitpunkt (T0) begann, unter Berücksichtigung der absoluten Änderungen zu T0, ergab sich ein signifikanter Zwischensubjekteffekt ($p=.022$). Hierbei zeigte sich in der Interventionsgruppe ein Abfall der Konzentrationen von TNF, wohingegen sich in der Kontrollgruppe kaum eine Änderung zu T0 zeigte.

3.1.3 IL-1 β

Für das Interleukin 1 β ergab der U-Test zur Analyse für Gruppenunterschiede zu einzelnen Messzeitpunkten keine signifikanten Ergebnisse.

Die Varianzanalyse mit Messwiederholung erbrachte ebenfalls keine signifikanten Gruppenunterschiede, weder abhängig noch unabhängig von der Zeit.

3.1.4 IL-6

Die durchgeführte Zytokinanalyse im Rahmen der RIPHeart-Studie ergab für das Interleukin 6 folgende Ergebnisse:

Bei nicht gegebener Normalverteilung zeigte die Analyse zu den einzelnen Messzeitpunkten T1 und T2 signifikante Gruppenunterschiede (U-Test).

Signifikante Unterschiede zwischen Behandlungs- und Interventionsgruppe abhängig als auch unabhängig von der Zeit konnten in der Varianzanalyse mit Messwiederholung nicht nachgewiesen werden.

Der zeitliche Innersubjekteffekt für das Gesamtkollektiv erwies mit $p=.035$ eine Signifikanz.

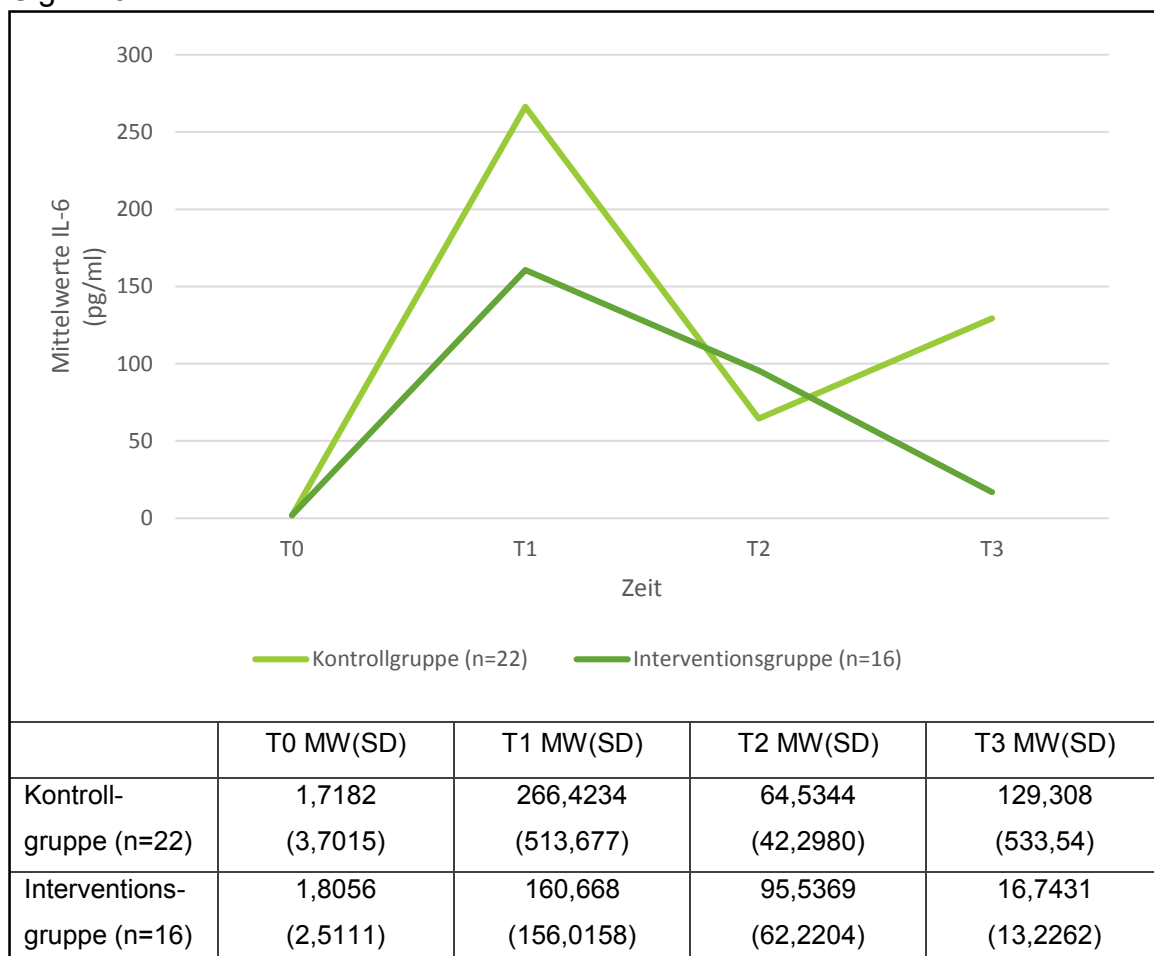


Abbildung 10: Zeitlicher Mittelwertverlauf von IL-6 in Interventions- und Kontrollgruppe

Die Abbildung 10 zeigt, dass die Behandlungsgruppe nach minimalem Wert zu Beginn im zeitlichen Verlauf ein Maximum nach 6 Stunden aufwies (Innersubjektkontrast T0 zu T1: $p=.003$). In dem Zeitraum von 6 bis 48 Stunden postoperativ fielen die Werte bei signifikantem Innersubjektkontrast. Dennoch lagen die IL-6-Konzentrationen 48 Stunden nach der Operation noch signifikant höher als die Ausgangswerte von T0. In den folgenden Tagen blieben die Konzentrationen stabil und ein zeitlicher Effekt ließ sich somit nicht mehr nachweisen (Innersubjektkontrast T2 zu T3: $p=.916$)

3.1.5 IL-8

Die erhobenen Werte für das Interleukin 8 waren nicht normalverteilt.

Der Vergleich beider Gruppen zu den einzelnen Zeitpunkten ergab keine signifikanten Unterschiede.

Die Analyse der Daten mit Hilfe der Varianzanalyse mit Messwiederholung ergab hinsichtlich des Interaktionseffektes der Gruppen keine Signifikanz sowohl zeitab- als auch zeitunabhängig.

Die Betrachtung beider Gruppen gemittelt erbrachte einen signifikanten zeitlichen Innersubjekteffekt ($p=.012$).

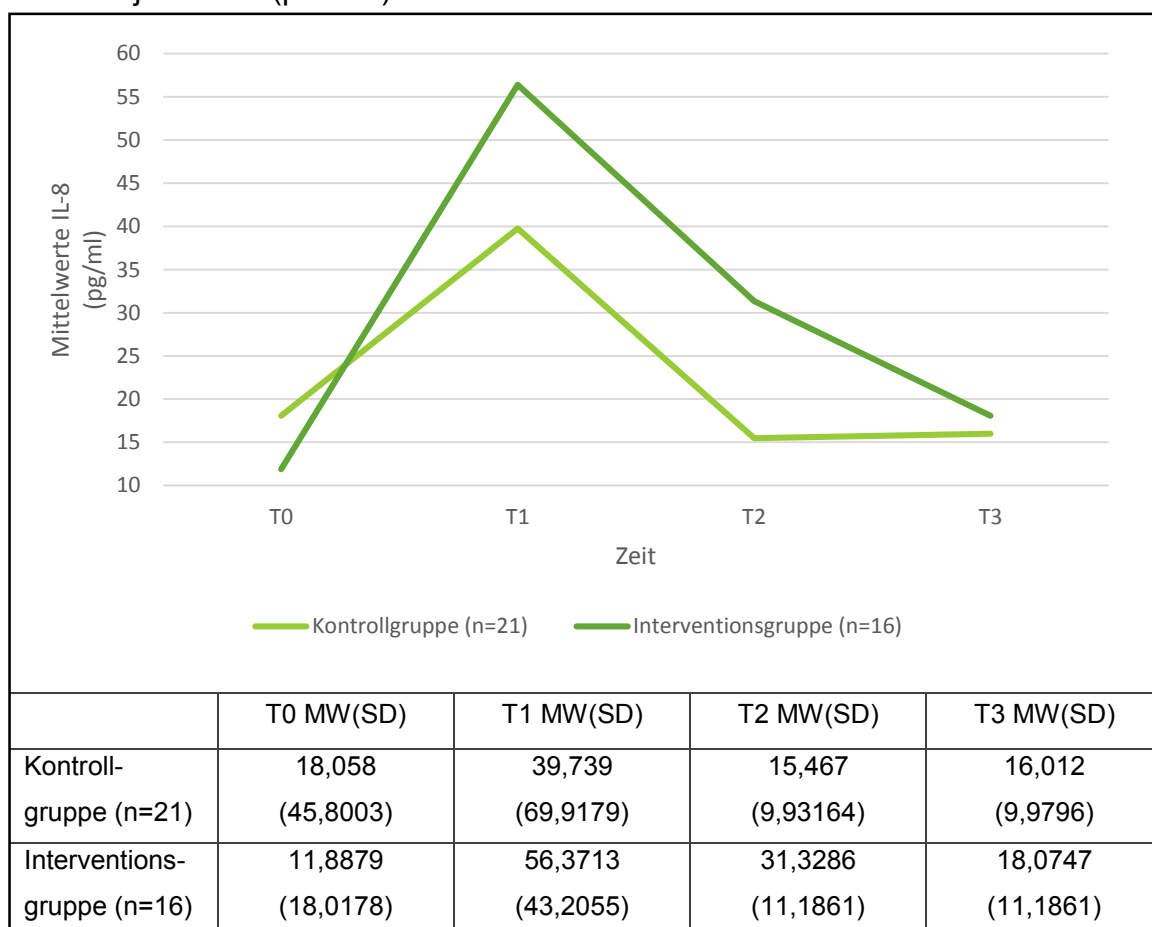


Abbildung 11: Zeitlicher Mittelwertverlauf von IL-8 in Interventions- und Kontrollgruppe

Die Abbildung 11 zeigt, dass die Konzentrationen des IL-8 direkt postoperativ deutlich anstiegen. Der Innersubjekt Kontrast zwischen T0 und T1 der gemittelten Gruppen war signifikant. Der darauffolgende Abfall der Werte von T1 zu T2 war ebenfalls signifikant ($p=.014$). Der scheinbar gruppenunterschiedliche Verlauf zwischen T2 und T3 ergab nicht signifikante Ergebnisse im Innersubjekt Kontrast ($p=.178$). Die Werte T2 und T3 verglichen mit dem Ausgangswert T0 ergaben in den Innersubjekt Kontrasten keine signifikanten Unterschiede.

Betrachtet man nur jene kleine Anzahl von Fällen, die zum Referenzzeitpunkt (T0) mit einem Wert ungleich 0 pg/ml für das Interleukin 8 starteten, nämlich zwei Patienten in der Behandlungs- und vier in der Kontrollgruppe, so zeigten sich in der Varianzanalyse mit Messwiederholung höchst signifikante Ergebnisse. Hierbei lag der Innersubjekteffekt Zeit, als auch der Innersubjekteffekt Zeit*FallKontroll bei $p<.001$. In dieser Betrachtung zeigte sich zudem ein signifikanter zeitunabhängiger Zwischensubjekteffekt der beiden Gruppen ($p=.006$).

3.1.6 IL-10

Bei nicht gegebener Normalverteilung ergab die Analyse des Zytokins IL-10 keine signifikanten Unterschiede zwischen Interventions- und Kontrollgruppe zu den vier Messzeitpunkten.

Die Gruppen zeigten mittels Varianzanalyse mit Messwiederholung keine signifikanten Unterschiede abhängig und unabhängig von der Zeit.

In beiden Gruppen erwies sich ein signifikanter zeitlicher Innersubjekteffekt ($p=.001$).

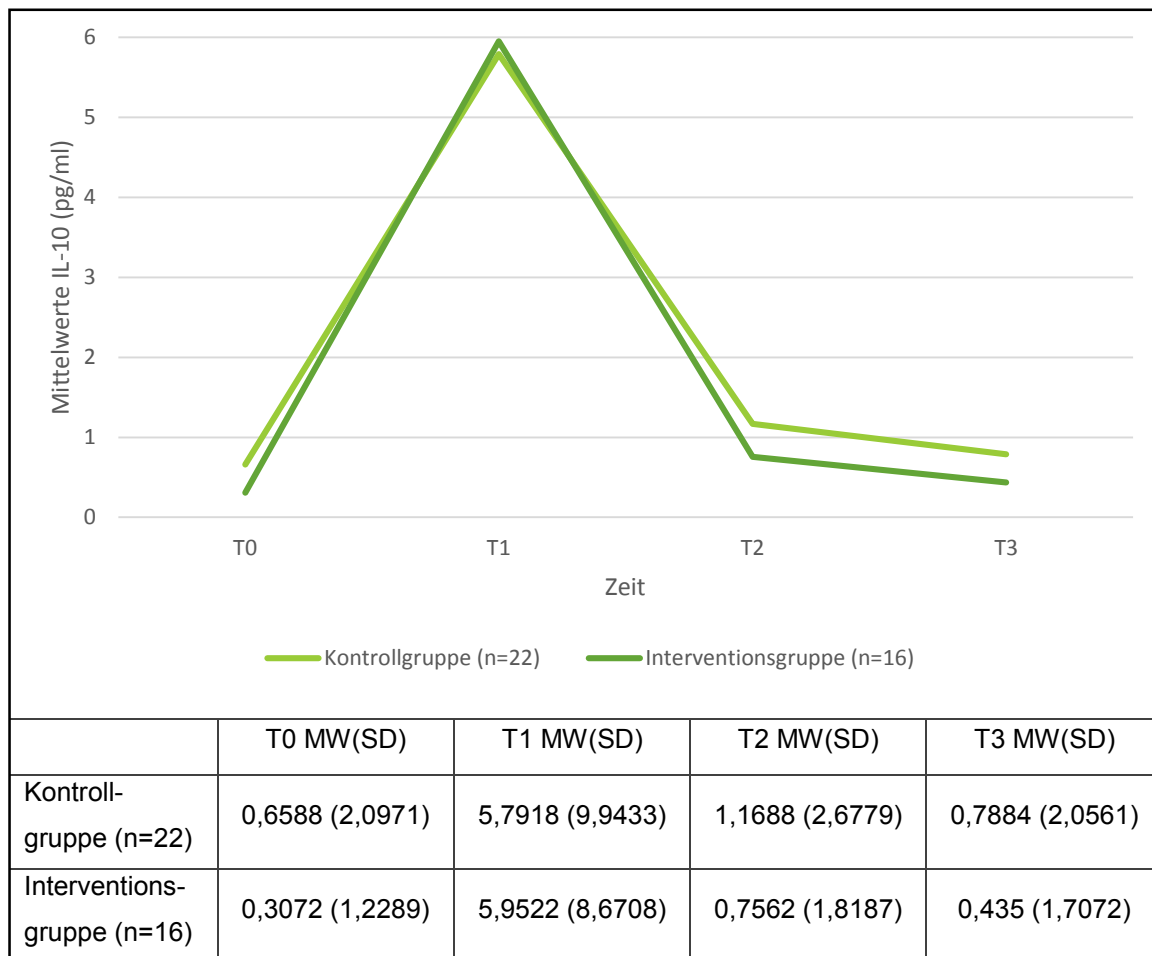


Abbildung 12: Zeitlicher Mittelwertverlauf von IL-10 in Interventions- und Kontrollgruppe

Beide Gruppen zeigten parallele zeitliche Verläufe. Mit einem p-Wert $<.001$ war der Innersubjekt Kontrast über die Zeit von T0 zu T1 höchst signifikant und wird in der Abbildung 12 als Konzentrationsanstieg gezeigt. Ebenso der Werteabfall von T1 zu T2 markiert einen höchst signifikanten ($p=.003$) Innersubjekt Kontrast. Da nach 48 Stunden bis zur Entlassung die Werte in etwa auf einem Niveau verblieben, ergab sich ein nicht signifikanter Innersubjekt Kontrast zwischen T2 und T3.

3.1.7 bFGF

Die erhobenen Daten für den basalen Fibroblasten- Wachstumsfaktor (bFGF) unterlagen keiner Normalverteilung. Zum Referenzzeitpunkt T0 waren die Mittelwerte der beiden Gruppen signifikant unterschiedlich.

Die varianzanalytische Untersuchung erfolgte anhand der absoluten Änderungen zu T0.

Die Varianzanalyse mit Messwiederholung zeigte für die absoluten Änderungen nicht signifikante Ergebnisse für den Zwischensubjekteffekt ($p=.514$). Ein Unterschied

zwischen Behandlungs- und Kontrollgruppe unabhängig vom zeitlichen Verlauf bestand nicht.

Auch für die Entwicklung über die Zeit erwies sich kein signifikanter Unterschied in Abhängigkeit von der Intervention (Innersubjekteffekt mit $p=.609$).

3.1.8 VEGF

Bei nicht normalverteilten Daten ergab die Analyse zu allen Zeitpunkten (T0 bis T3) signifikante Unterschiede zwischen RIP-Patienten und Patienten der Kontrollgruppe.

Die Varianzanalyse mit Messwiederholung ergab, dass sich beide Gruppen gemittelt höchst signifikant über die Zeit hinweg verändern (zeitlicher Innersubjekteffekt: $p<.001$), jedoch unterscheiden sich die Gruppen in ihrem zeitlichen Verlauf nicht, weshalb der Innersubjekteffekt zum Gruppenunterschied über den zeitlichen Verlauf nicht signifikant war. Der zeitunabhängige Unterschied zwischen Interventions- und Kontrollgruppe war signifikant, was sich im höheren Werteniveau der Interventionsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe widerspiegelt. Diese Ergebnisse sind im nahezu parallelen Verlauf beider Gruppen über die Zeit hinweg ersichtlich.

In Abbildung 13 zeigt sich über den zeitlichen Verlauf zunächst ein relativ konstantes Werteniveau in den ersten 48 Stunden nach dem kardiochirurgischen Eingriff. In der Zeit von 48 Stunden postoperativ bis zur Entlassung stiegen die Mittelwerte, sodass die Maxima der erhobenen Daten schließlich zu T3 erreicht wurden.

Die Ergebnisse der Innersubjektkontraste zeigten, dass der gemittelte Anstieg beider Gruppen von T1 zu T2, sowie von T2 zu T3 signifikant war. Die Veränderung in den ersten postoperativen Stunden hingegen war zu gering für eine signifikante Konzentrationsänderung von VEGF. Da die gemittelte Kurve stets ansteigende Tendenz zeigt, waren auch die Kontraste von T2 zu T0 und T3 zu T0 signifikant.

In dem Zeitraum zwischen 6 und 48 Stunden postoperativ besteht zudem ein zeitlich abhängiger Gruppenunterschied. Die Interventionsgruppe wies in diesem Zeitraum eine Konzentrationszunahme auf, wohingegen die Kontrollgruppe nahezu stabil blieb.

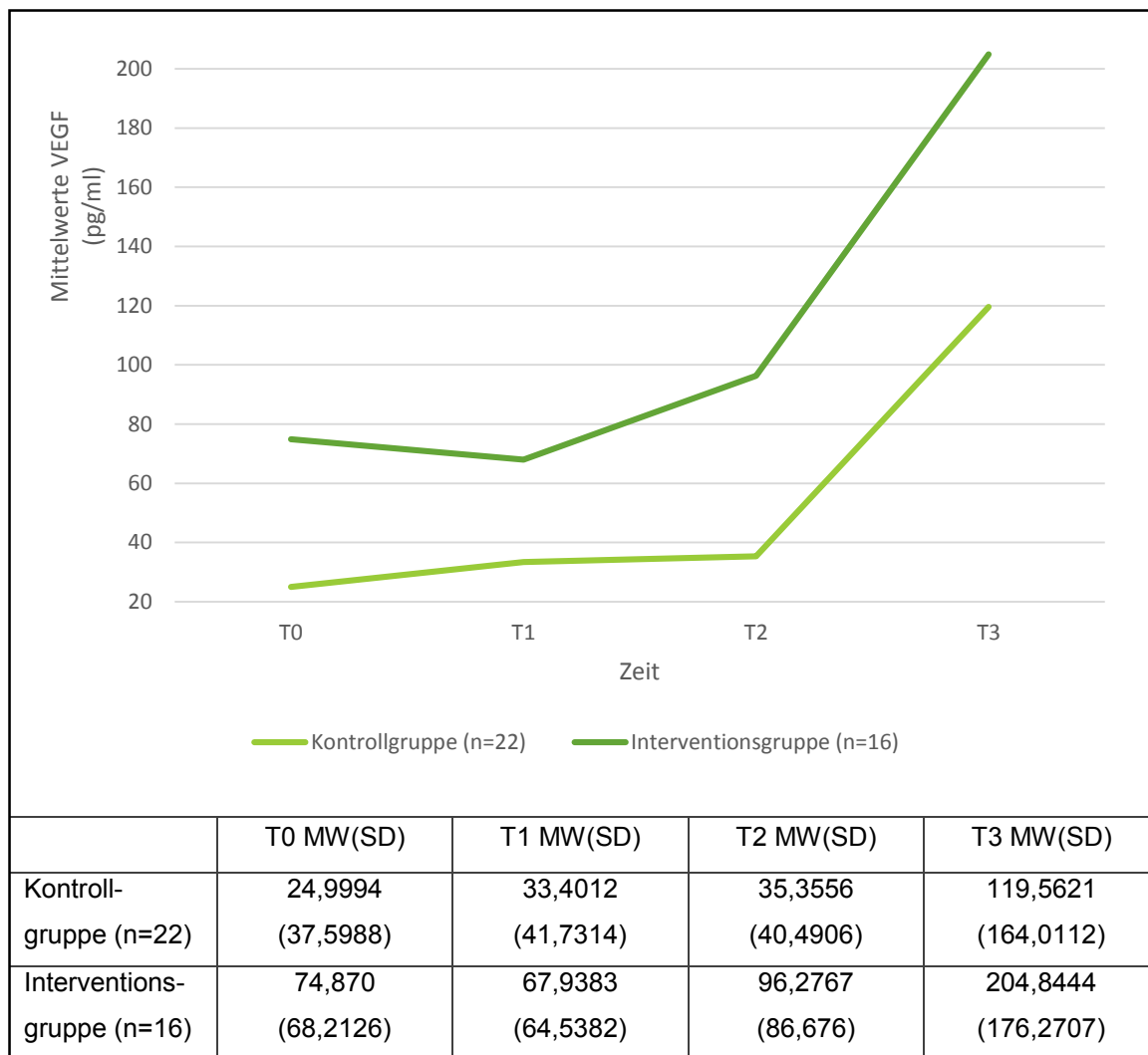


Abbildung 13: Zeitlicher Mittelwertverlauf von VEGF in Interventions- und Kontrollgruppe

Nach Berechnung der absoluten Änderungen der Werte T1 bis T3 jeweils zu T0 (siehe Material und Methoden) ergaben sowohl der U-Test als auch die repANOVA keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Unterteilt man die Fälle weiter in diejenigen, die mit dem Wert 0 pg/ml bei T0 starten und jene, die zu T0 Werte > 0 pg/ml zeigen, so ließ sich ein signifikanter Innersubjekteffekt alleinig über die Zeit und als auch über die Zeit hinweg zwischen Fall- und Kontrollgruppe nur in der zweiten Gruppe zeigen (VEGF > 0 pg/ml zu T0, Behandlungsgruppe $n=13$, Kontrollgruppe $n=12$). Die Signifikanz der Innersubjekteffekte bestand auch für diese Gruppe bei der Analyse der absoluten Änderungen zu T0.

Der Zwischensubjekteffekt zeigte bei der Analyse des derart aufgeteilten Datensatzes nur für die absoluten Werte der zweiten Gruppe (VEGF > 0 pg/ml zu T0, Behandlungsgruppe $n=13$, Kontrollgruppe $n=12$) eine Signifikanz ($p<.005$)

3.1.9 G-CSF

Bei nicht gegebener Normalverteilung ergibt sich ein signifikanter Gruppenunterschied zu Beginn der Untersuchung (T0).

Sowohl für die Analyse der absoluten Werte als auch für die absoluten Änderungen zeigte sich ein signifikanter Innersubjekteffekt. Der Unterschied zwischen Fall- und Kontrollgruppe war sowohl abhängig von der Zeit als auch zeitunabhängig nicht signifikant.

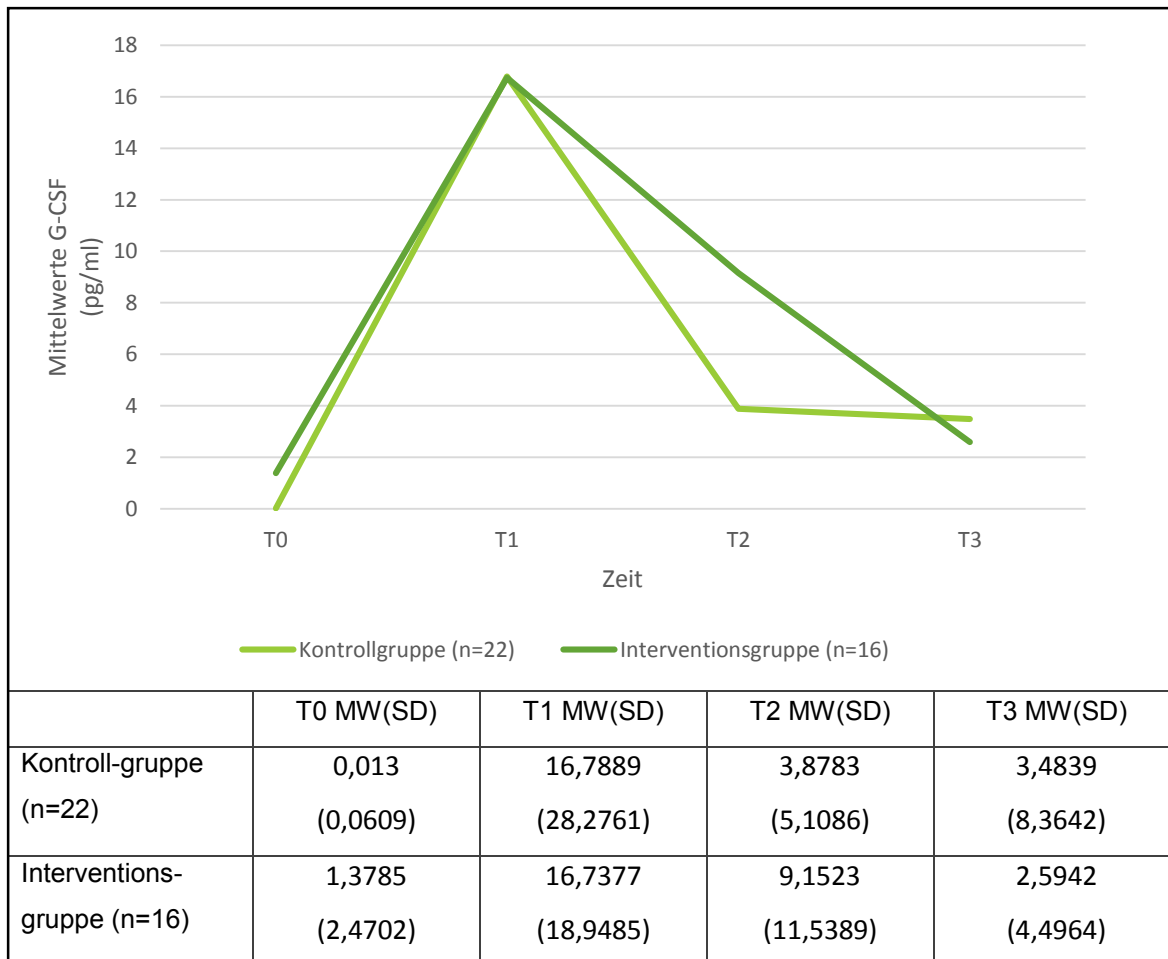


Abbildung 14: Zeitlicher Mittelwertverlauf von G-CSF in Interventions- und Kontrollgruppe

Abbildung 14 zeigt im zeitlichen Verlauf, dass die Mittelwerte in beiden Gruppen von minimalen Ausgangswerten vor der Operation in den sechs Stunden postoperativ anstiegen und zu T1 den maximalen gemessenen Wert erreichten. Danach fielen in beiden Gruppen die Werte ab. Der zeitliche Verlauf beider Gruppen gemittelt war sowohl zwischen nebeneinanderliegenden Zeitpunkten signifikant als auch zwischen jedem der Zeitpunkte zu T0. Die Entwicklung beider Gruppen zwischen den Zeitpunkten T2 und T3 wies eine Tendenz in Richtung signifikantem

Gruppenunterschied auf ($p=.069$). Abbildung 14 visualisiert einen stärkeren Abfall der G-CSF-Konzentrationen im Blut der Interventionsgruppe.

3.2 Analyse zirkulierender Endothelzellen (CEC)

3.2.1 Deskriptive Statistik

3.2.1.1 Altersverteilung

In die Analyse der zirkulierenden Endothelzellen (CEC) wurden die Ergebnisse von 39 Patienten einbezogen. Bei einer Altersspannweite von 56 Jahren war der jüngste Patient 26 Jahre alt, der älteste 82 Jahre alt. Es ergibt sich ein Mittelwert von 63,46 Jahren mit Standardabweichung von 11,5 Jahren.

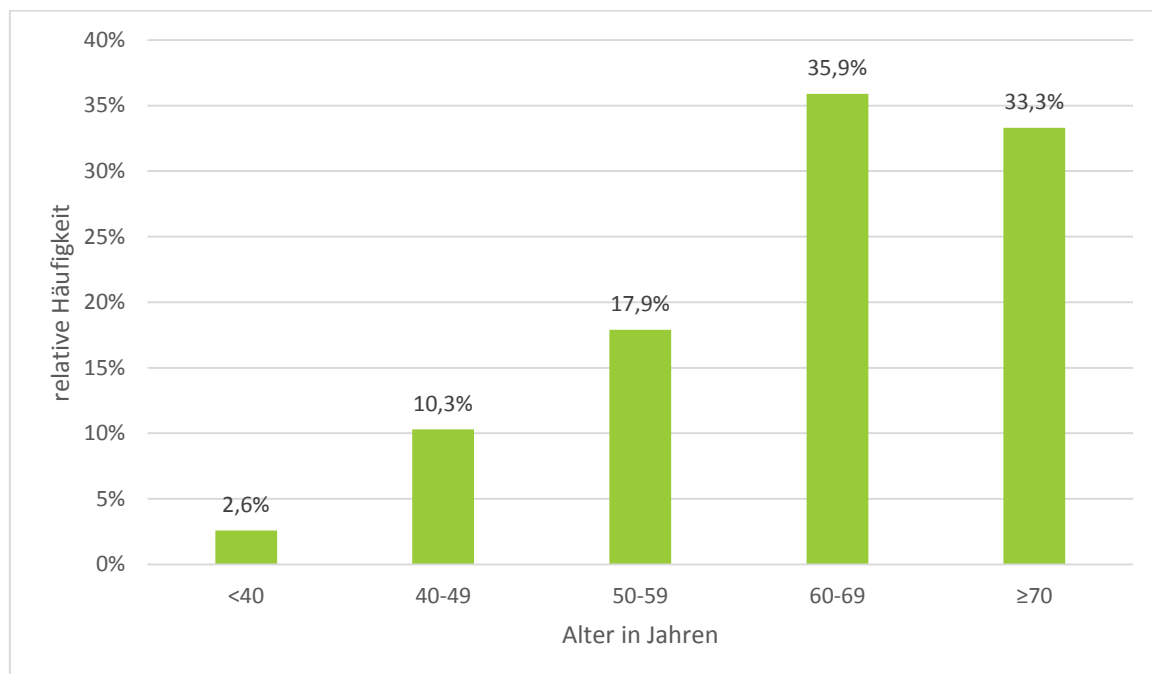


Abbildung 15: Gruppierte Altersverteilung der CEC- Analyse

Abbildung 15 stellt die Altersstruktur der in die CEC-Analyse eingeschlossenen Patienten dar.

3.2.1.2 Geschlechterverteilung

Von 39 Patienten waren 9 Probanden weiblich (23,1%) und 30 Probanden männlich (76,9%).

3.2.1.3 Art der Operation

Mit 44,7% machten reine aortokoronare Bypass-Operationen den Großteil der durchgeführten Operationen aus. Kardiochirurgische Eingriffe ohne ACB machten 28,9% aus. Ein Kombinationseingriff, bei dem ein ACB enthalten war, lag zu 26,3% vor.

3.2.1.4 Präoperative Ejektionsfraktion

Überwiegend hatten die Patienten präoperativ eine normwertige Ejektionsfraktion. 17,1% der Patienten hatten bei dieser Untersuchung eine leicht- bis mittelgradig eingeschränkte Ejektionsfraktion.

3.2.1.5 Tageszeit der Operation

64,1% der Operationen wurden morgens durchgeführt. 35,9% der kardiochirurgischen Eingriffe begannen gegen 12 Uhr.

3.2.2 CD45-negative, CD146-positive, CD31-positive Zellen

Für die Zellen mit der Eigenschaft CD45- CD146+ CD31+ ergab sich in der Interventionsgruppe eine normalverteilte Stichprobe, für die Kontrollgruppe lagen die Werte nicht normalverteilt vor.

Das nonparametrische Verfahren ergab für den 6-Stunden-postoperativen Wert einen signifikanten Unterschied ($p=.031$) zwischen den Gruppen. Zu den Zeitpunkten T0, T2 und T3 zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

Die Varianzanalyse mit Messwiederholung ergab einen höchst signifikanten Innersubjekteffekt ($p=.004$) beider Gruppen gemittelt über den zeitlichen Verlauf.

Ein signifikanter Unterschied zwischen Behandlungs- und Kontrollgruppe, sowohl zeitabhängig (Innersubjekteffekt) als auch zeitunabhängig (Zwischensubjekteffekt), zeigte sich nicht.



Abbildung 16: Zeitlicher Mittelwertverlauf von CD45- CD146+ CD31+ Zellen in Interventions- und Kontrollgruppe

Abbildung 16 zeigt die Kurven beider Gruppen von T0 bis T3 mit abfallender Wertetendenz. Hierbei waren der zeitliche Unterschied beider Gruppen gemittelt zwischen T2 und T3 (Innersubjektkontraste), sowie die Werteabnahme von T0 bis T3 statistisch signifikant. Der in der Abbildung ersichtliche Anstieg der Kontrollgruppe zwischen T1 und T2 und der gleichzeitige Abfall der Interventionsgruppe sind nicht signifikant unterschiedlich.

3.2.3 CD45-negative, CD146-positive, CD31-positive, CD105-positive Zellen

Der statistischen Auswertung der Zellpopulation mit den Eigenschaften CD45- CD146+ CD31+ CD105+ lagen nicht normalverteilte Ergebnisse zugrunde.

Es lagen keine signifikanten Gruppenunterschiede zu den einzelnen Zeitpunkten vor.

In der Varianzanalyse mit Messwiederholung waren sämtliche Effekte nicht signifikant. Lediglich der Innersubjekt Kontrast für den zeitlichen Verlauf zwischen T0 und T3 ergab eine Signifikanz. Die über beide Gruppen gemittelte Werteabnahme vom präoperativen Wert bis hin zur Entlassung ist somit als statistisch signifikant anzusehen.

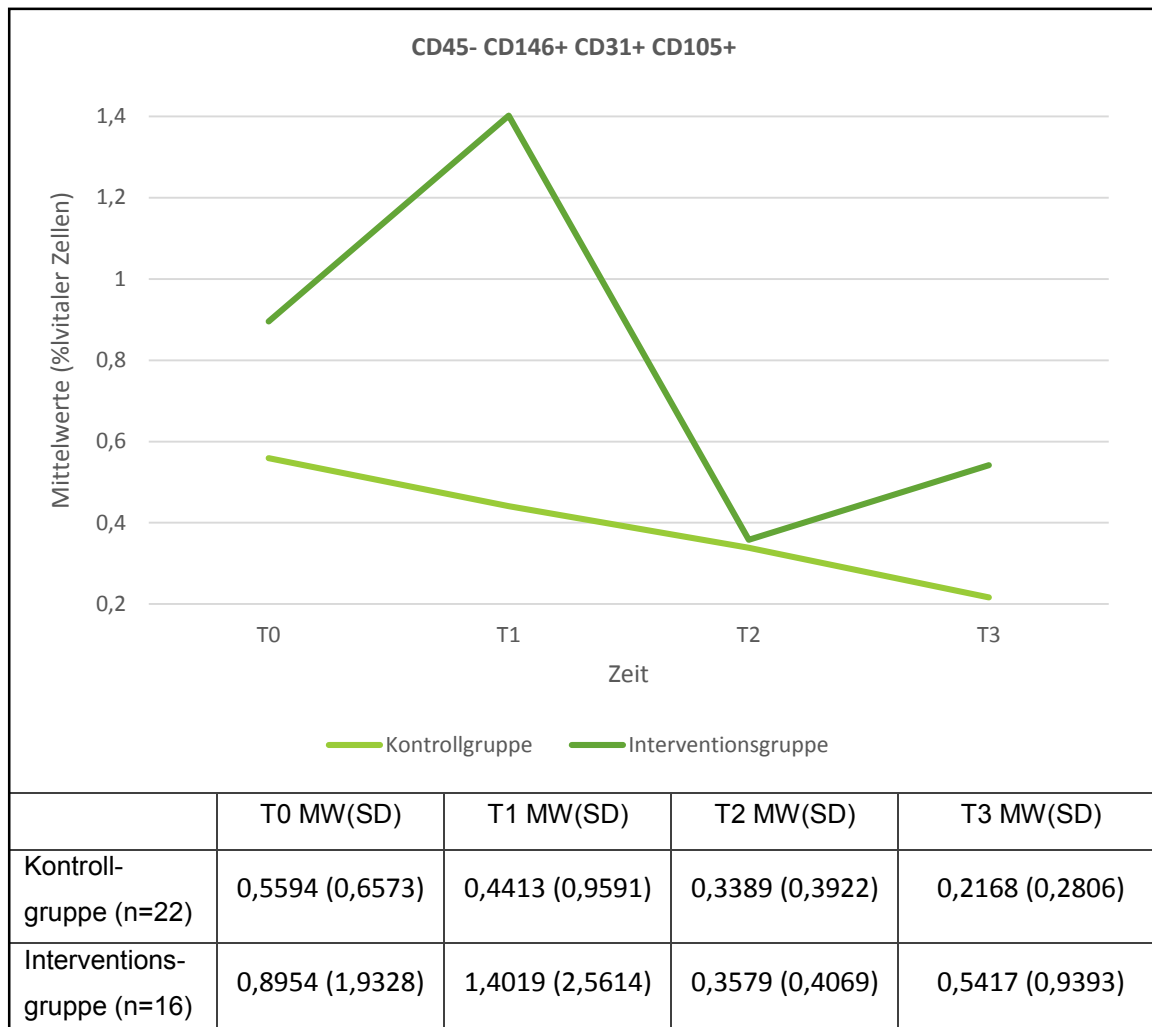


Abbildung 17: Zeitlicher Mittelwertverlauf von CD45- CD146+ CD31+ CD 105+ Zellen in Interventions- und Kontrollgruppe

3.2.4 CD45-negative, CD146-positive, CD105-positive Zellen

Die Daten für die CD45- CD146+ CD105+ Zellen waren nicht normalverteilt.

Es ergaben sich für die vier Zeitpunkte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Die Innersubjekteffekte in der Varianzanalyse mit Messwiederholung ergaben für die gemittelte zeitliche Entwicklung einen p-Wert von .022, der zeitliche Effekt zwischen den Gruppen ist mit $p=.058$ grenzwertig nicht signifikant.

Der zeitunabhängige Gruppenunterschied als Zwischensubjekteffekt konnte statistisch nicht belegt werden.

Die Innersubjektkontraste ergaben für die zeitliche Entwicklung beider Gruppen zwischen T1 und T2 sowie zwischen T0 und T3 signifikante Ergebnisse. Eine signifikant unterschiedliche Entwicklung zwischen den Gruppen zeigte sich zwischen T1 und T2.

Die Grafik zeigt, dass in der Interventionsgruppe die Werte von T0 zu T1 anstiegen, in der Kontrollgruppe hingegen abfielen. Der Gruppenunterschied zwischen T0 und T1 ist mit $p=.06$ jedoch nicht signifikant. Die Entwicklung der Werte zwischen T1 zu T2 zeigte in der Interventionsgruppe einen deutlich steileren Abstieg, sodass sich eine signifikant unterschiedliche Entwicklung in den Gruppen im Innersubjektkontrast zeigte. Der signifikante Innersubjektkontrast beider Gruppen als Unterschied zwischen T0 und T3 besagt, dass unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit die Werte im zeitlichen Verlauf abnahmen.

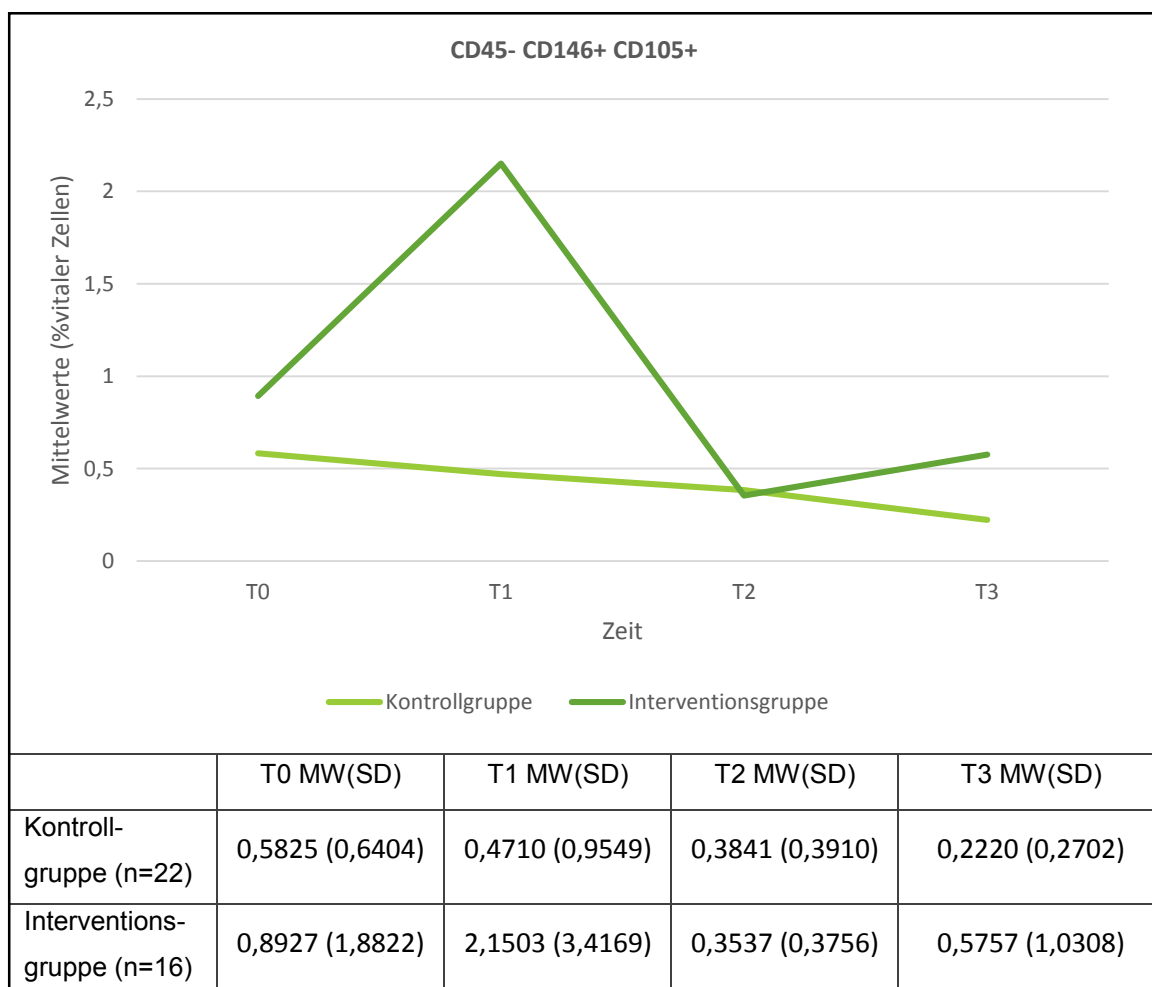


Abbildung 18: Zeitlicher Mittelwertverlauf von CD45- CD146+ CD 105+ Zellen in Interventions- und Kontrollgruppe

3.2.5 CD45-negative, CD146-positive, CD105-positive, CD34-positive Zellen

Die Daten der CD45- CD146+ CD105+ CD34+ Zellpopulation waren bis auf die Baselinemessung der Fallgruppe stets nicht normalverteilt.

Für T0 bzw. T2 ergab die Analyse mit $p=.003$ bzw. T2: $p=.032$ signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen.

Der zeitliche Innersubjekteffekt ergab eine Signifikanz. Die weiteren Effekte in der repANOVA blieben ohne signifikante Ergebnisse.

Die Untersuchung der Innersubjektkontraste ergab für beide Gruppen gemeinsam betrachtet einen signifikanten Unterschied der Werte zwischen T0 und T3.

Wie in der Abbildung dargestellt, kam es über die zeitliche Entwicklung zu einem Werteabfall in beiden Gruppen, wobei auch der Unterschied beider Graphen zu T0 sichtbar wird.

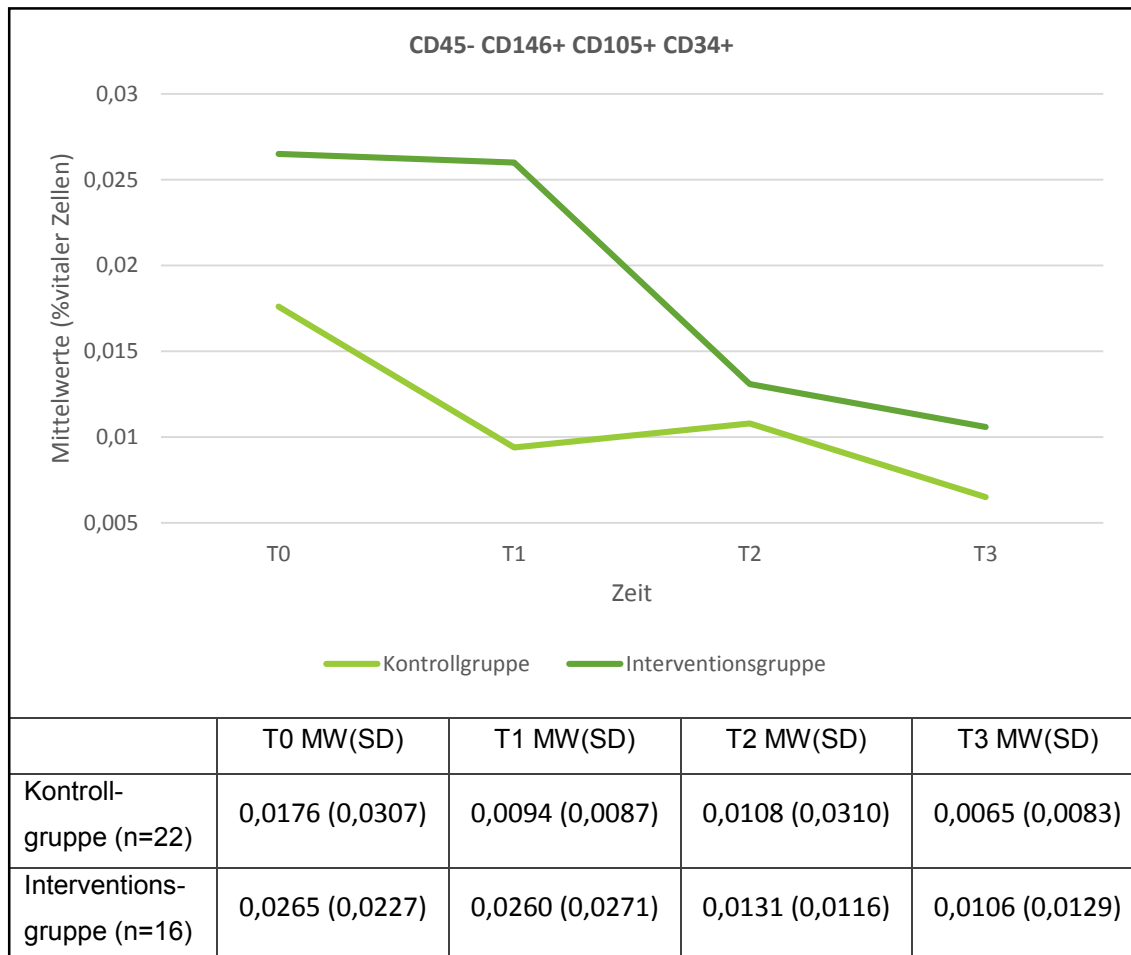


Abbildung 19: Zeitlicher Mittelwertverlauf von CD45- CD146+ CD 105+ CD34+ Zellen in Interventions- und Kontrollgruppe

3.2.6 CEC-Zellen

Die CEC-Zellpopulationsdaten waren bis auf den Zeitpunkt T0 in der Interventionsgruppe stets nicht normalverteilt.

Für T0, T2 und T3 stellten sich signifikante Unterschiede zwischen Kontroll- und Interventionsgruppe dar.

In der Varianzanalyse mit Messwiederholung ergaben sich Signifikanzen für den Innersubjekteffekt Zeit sowie für den Zwischensubjekteffekt- den zeitunabhängigen Unterschied beider Gruppen.

Der Innersubjektkontrast T0 zu T3 war für beide Gruppen gemeinsam betrachtet signifikant.

Die Abbildung 20 zeigt den unterschiedlichen Beginn beider Gruppen zu T0 und den sich als signifikant erwiesenen Werteabfall von T0 zu T3 sowohl in der Kontroll- als auch in der Interventionsgruppe.

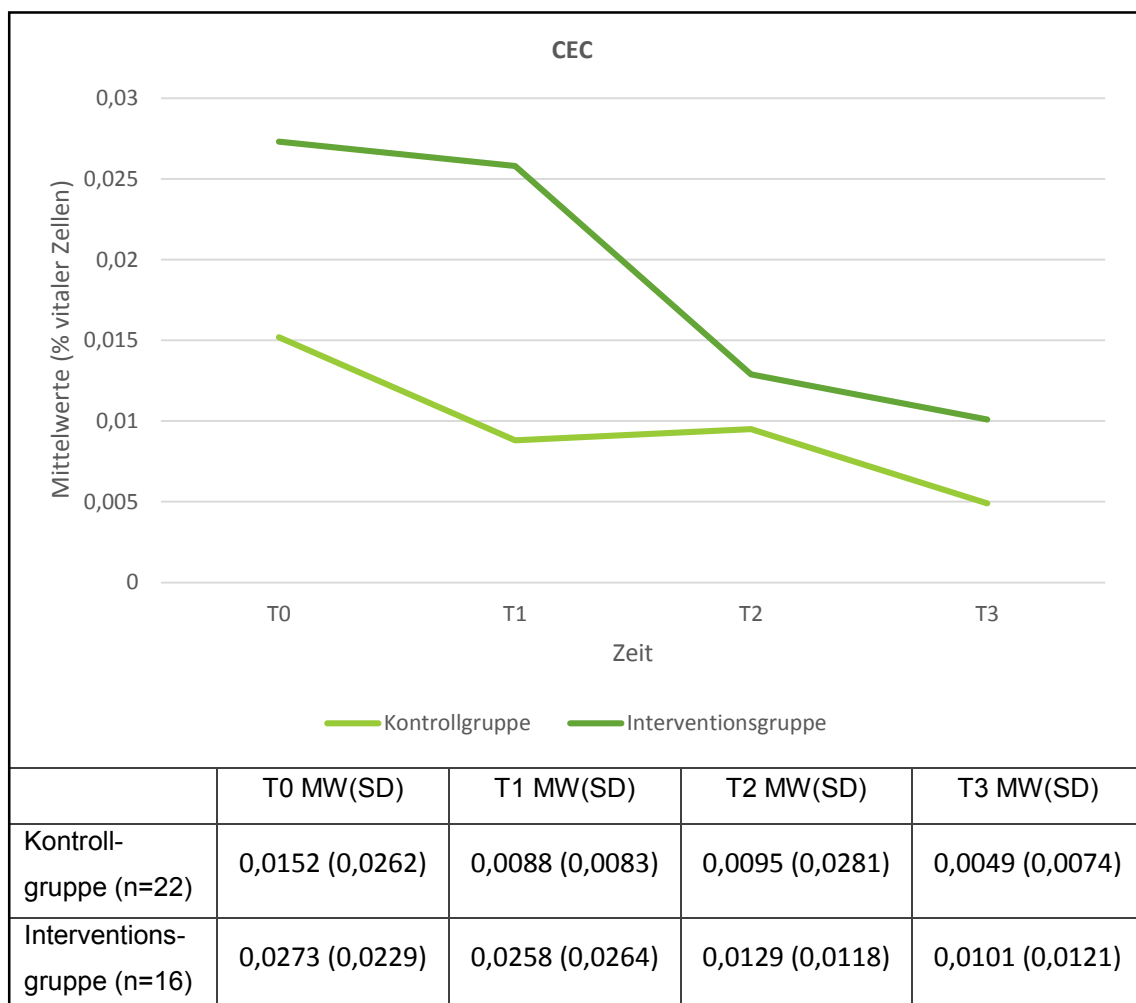


Abbildung 20: Zeitlicher Mittelwertverlauf von CEC-Zellen in Interventions- und Kontrollgruppe

3.2.7 CD45-negative bis schwach positive, CD34-positive, CD133-negative, CD146-positive Zellen

Die Daten der CD45-/dim CD34+ CD133- CD146+ Zellpopulation waren abgesehen von der Fallgruppe zum Zeitpunkt T0 stets nicht normalverteilt.

Es ergaben sich keine signifikanten Gruppenunterschiede.

Alle weiteren Analysen mit Hilfe der repANOVA ergaben ebenfalls keine Signifikanzen.

3.2.8 CD45-negative bis schwach positive, CD34-positive, CD133-positive, CD146-negative Zellen

In der CD45-/dim CD34+ CD133+ CD146- Zellpopulation zeigte sich bis auf die Zeitpunkte T0 und T2 in der Kontrollgruppe eine nicht normalverteilte Datenlage.

Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und Interventionsgruppe zu den einzelnen Messzeitpunkten erfasst werden.

Die Varianzanalyse mit Messwiederholung ergab einen signifikanten zeitlichen Innersubjekteffekt ($p=.013$).

Die Innersubjektkontraste für beide Gruppen zeigten signifikante Ergebnisse für die zeitliche Entwicklung zwischen T0 zu T1, T1 zu T2, T2 zu T3 sowie zwischen T0 zu T2.

Die Innersubjektkontraste zwischen Interventions- und Kontrollgruppe ergaben Signifikanzen für die zeitliche Entwicklung zwischen T0 zu T1 und zwischen T0 zu T2. Die Abbildung zeigt, dass in der mit Ischämischer Präkonditionierung behandelten Gruppe die Werte von T0 zu T1 abfielen, wohingegen die Werte der Kontrollgruppe stiegen. Die Graphen der Gruppen verlaufen ab T1 nahezu parallel mit zu T2 abfallenden und zu T3 wieder ansteigenden Werten.

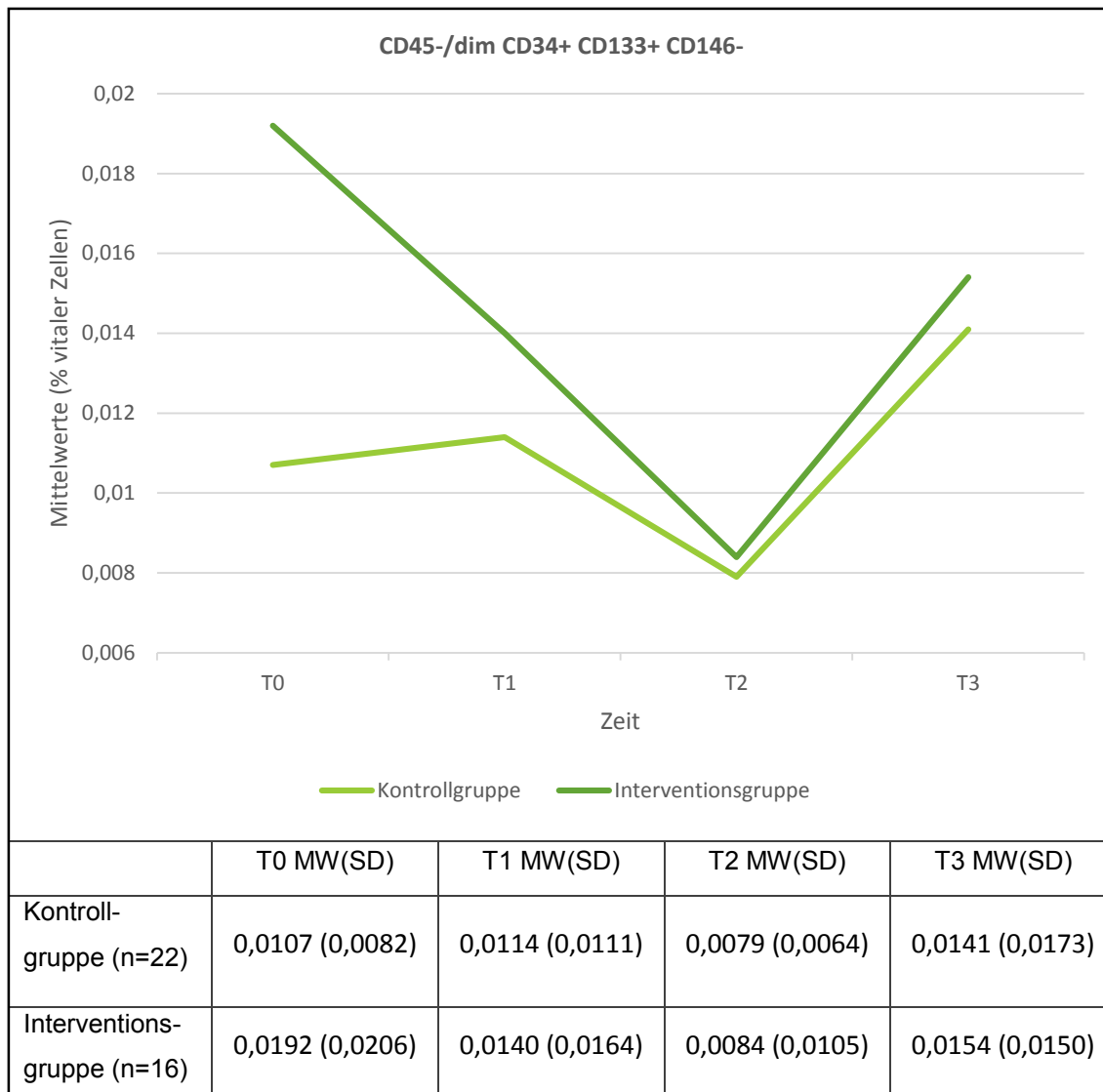


Abbildung 21: Zeitlicher Mittelwertverlauf von CD45-/dim CD34+ CD 133+ CD146- Zellen in Interventions- und Kontrollgruppe

3.2.9 CD45-negative bis schwach positive, CD34-positive, CD133-positive Zellen

Die CD45-/dim CD34+ CD133+ Zellpopulationsdaten waren normalverteilt für beide Gruppen für T0 und T2, in der Kontrollgruppe zudem für T3. Alle weiteren Daten wiesen keine Normalverteilung auf.

Zu den einzelnen Zeitpunkten gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und Interventionsgruppe.

Die Untersuchung mittels repANOVA ergab einen signifikanten Innersubjekteffekt Zeit mit $p=.003$ und einen signifikanten Innersubjekteffekt von Zeit und Intervention mit $p=.042$.

Die Innersubjektkontraste für den zeitlichen Verlauf beider Gruppen ergaben signifikante Unterschiede für die Werte von T1 und T2, T2 und T3 sowie für T0 und T2 als auch T0 und T3.

Einen signifikanten Gruppenunterschied ergab der Innersubjektkontrast für die Werte zwischen T2 und T3 sowie zwischen T0 und T3.

Die Abbildung 22 zeigt einen nahezu parallelen Verlauf beider Graphen zwischen T0 und T1 mit nur geringer Werteveränderung. Zwischen T1 und T2 fallen die Werte in beiden Gruppen. Der nachfolgende Werteanstieg von T2 zu T3 ist in der Interventionsgruppe steiler als in der Kontrollgruppe. Insgesamt liegt das Werteniveau zu T3 in der Interventionsgruppe deutlich höher als zu T0, wohingegen das Werteniveau der Kontrollgruppe sich kaum verändert hat.

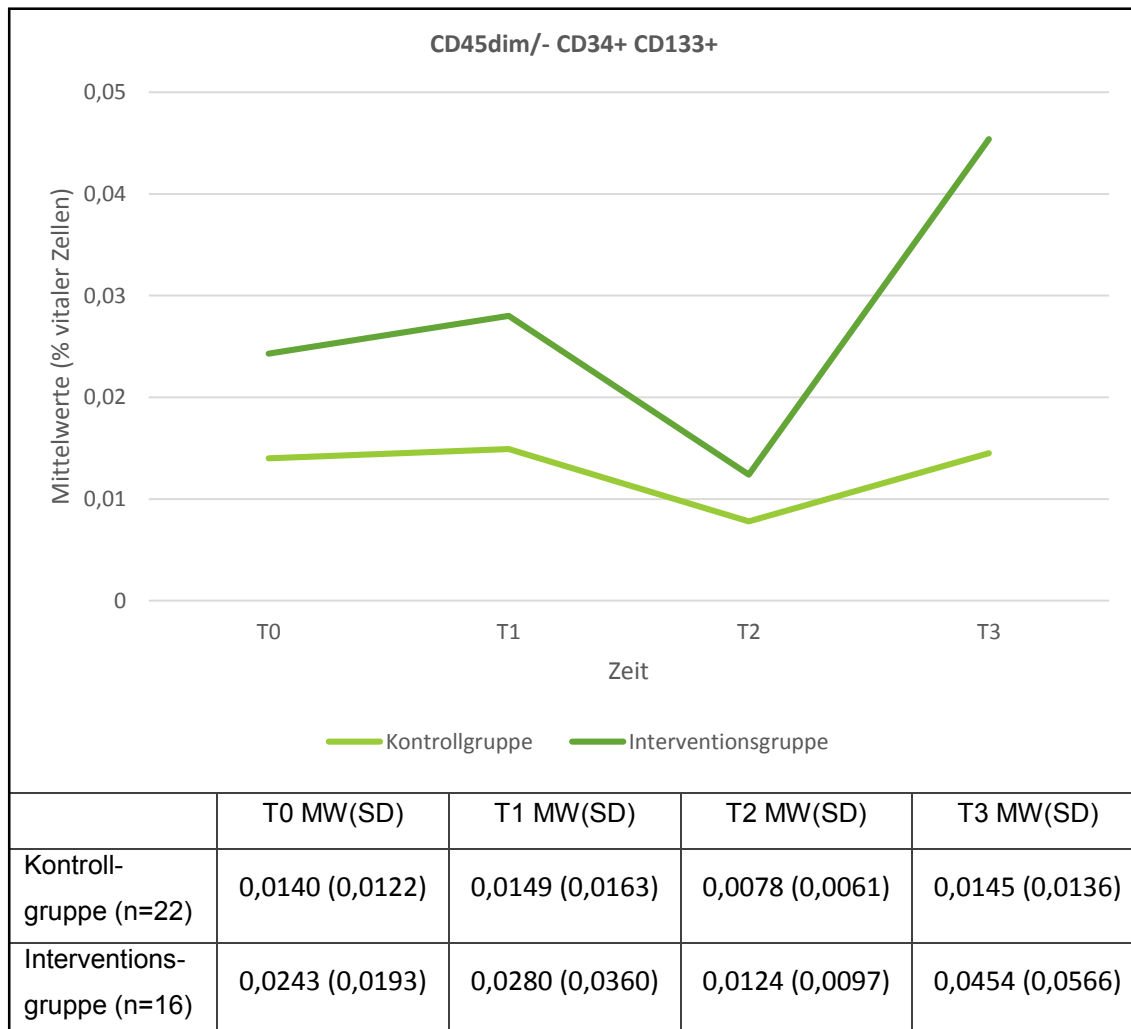


Abbildung 22: Zeitlicher Mittelwertverlauf von CD45-/dim CD34+ CD133+ Zellen in Interventions- und Kontrollgruppe

4 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es anhand durchflusszytometrischer Verfahren den Einfluss der Ischämischen Präkonditionierung im Rahmen von Herzoperationen mit Herz-Lungen-Maschine auf ausgewählte Zellpopulationen und Zytokine zu analysieren.

Das Studiendesign der klinisch kontrollierten RIPHeart-Studie entspricht einem hohen wissenschaftlichen Standard durch doppelte Verblindung und Multizentrität mit einer hohen Fallzahl. Strukturgleichheit wird durch das Randomisieren der eingeschlossenen Patienten erreicht. Dabei gilt die Studie als „kontrolliert“, da die beiden Gruppen sich tatsächlich nur durch die Behandlung unterscheiden sollten und für andere Merkmale wie Alter, Art des Eingriffs und Geschlecht Äquivalenz zwischen beiden Gruppen herrscht. Für die vorliegende Arbeit wurden Daten von 46 Patienten aus dem Rostocker Patientenkollektiv der RIPHeart-Studie erhoben, die Fallzahl ist somit wesentlich kleiner als die der gesamten Multicenterstudie.

Die Methode der durchflusszytometrischen Zelldifferenzierung und Quantifizierung ist ein wissenschaftlich etabliertes Verfahren. Untersuchungen, die die Durchflusszytometrie mit Immunomagnetischer Bead-Isolation zur Detektion von CECs miteinander verglichen, stellten keinen signifikanten Unterschied der beiden Methoden dar, sodass sich beide Verfahren gleichermaßen für die Untersuchungen eignen (Goon, Patrick K Y et al. 2006).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine postoperative Reaktion des Immunsystems gezeigt werden, sodass sowohl pro- als auch anti-inflammatorische (IL-6/ IL-8; IL-10) Zytokine vermehrt sezerniert wurden.

Bezüglich der Intervention mit Ischämischer Fernkonditionierung gab es für die Sekretion von TNF einen Gruppeneffekt, sodass sich postoperativ in der Behandlungsgruppe ein stärkerer Rückgang dieses pro-inflammatorischen Zytokins zeigte.

Die CD146-exprimierenden, als zirkulierende Endothelzellen bezeichneten Zellen zeigten postoperativ eine Werteabnahme.

Ein Gruppenunterschied durch die Ischämische Präkonditionierung konnte lediglich zwischen T1 und T2 bei der CD45- CD146+ CD105+ Zellpopulation gezeigt werden. Endotheliale Progenitorzellen mit CD34+ und CD133+ waren nach dem Eingriff in höherer Zahl im peripheren Blut zu finden. Für die CD45-negativ-bis schwach

positive, CD34-positive, CD133-positive, CD146-negative Zellpopulation zeigte sich postoperativ eine schnellere Rekrutierung dieser Zellen in das Zielgewebe.

Zytokine

Ein kardiochirurgischer Eingriff hat einen sehr komplexen Einfluss auf diverse Organsysteme – das Immunsystem eingeschlossen. Als Ausdruck der körpereigenen Antwort auf die Operation können unter anderem die Zytokinkonzentrationen im peripheren Blut betrachtet werden.

Lecour und James (2011) zeigten, dass Ischämische Konditionierung einen Mechanismus aktivieren kann, welcher wiederum durch Erhöhung pro-inflammatorischer Zytokine (IL-6 und TNF) die Regeneration des geschädigten Myokards fördert. Der zu den pro-inflammatorischen Zytokinen gehörige Tumor-Nekrose-Faktor TNF zeigte in der vorliegenden Untersuchung jedoch einen kontrastierenden Effekt. Postoperativ wies die Patientengruppe, die mit Ischämischer Präkonditionierung behandelt worden war, eine Konzentrationsabnahme auf. In der weiteren Untersuchung der pro-inflammatorischen Zytokine (IL-1, IL-6, IL-8) konnte kein Gruppenunterschied durch die Behandlung nachgewiesen werden. Die Veränderung im zeitlichen Verlauf hingegen war für Interleukin-6 und -8 in beiden Gruppen signifikant. Diese Zytokine stiegen beim gesamten Patientenkollektiv zunächst an und erreichten zum ersten postoperativen Messzeitpunkt ihre Maximalwerte, danach fielen die Konzentrationen wieder ab. Die Ergebnisse können als Korrelation zwischen Organschädigung und Zytokinausschüttung nach der Herz-Operation angesehen werden (De'Ath et al. 2013; Emura und Usuda 2010).

De'Ath et al. (2013) untersuchten hierzu TNF- α , IL-1 β , IL-6 und IL-8 bei Traumapatienten zum Zeitpunkt der Aufnahme ins Krankenhaus sowie nach 24 und 72 Stunden und sahen bei Patienten, die ein sekundäres kardiales Ereignis entwickelten, bereits zum Aufnahmezeitpunkt höhere Plasmaspiegel von TNF- α , IL-6 und IL-8. Nach 72 Stunden zeigten sich bei den Patienten mit kardialen Ereignis weiterhin erhöhte IL-1 β - sowie IL-8-Werte. Die Untersuchungen von De'Ath et al. (2013) zeigten, dass die Patientengruppe, die neben erhöhtem TNF, IL-6 oder IL-8 kombiniert eine Erhöhung von Troponin I aufwies, die höchste Letalität hatte.

Der singuläre Gruppenunterschied im Bereich des TNF unterstreicht die Vermutung eines Einflusses der Ischämischen Präkonditionierung. Zwar ließen sich anhand der

untersuchten Gruppengröße teils signifikante Aussagen über den Einfluss der RIP-Behandlung zeigen, zur hinreichenden Erklärung des Mechanismus ist die Kohorte jedoch nicht groß genug. Zudem fehlt aktuell eine Korrelation zum klinischen Effekt des Verfahrens, da die klinischen Studienergebnisse hierzu noch ausstehen.

Das zu den anti-inflammatorischen Zytokinen zählende Interleukin-10 verhält sich im zeitlichen Verlauf ebenso wie IL-6 und IL-8. Postoperativ gibt es einen deutlichen Anstieg der Interleukinkonzentration, wobei die Werte zwei Tage nach der Operation wieder nahezu auf Ausgangsniveau abgesunken waren und im weiteren Verlauf etwa konstant blieben. Der herzchirurgische Eingriff fördert demnach sowohl die Ausschüttung pro- wie auch anti-inflammatorischer Zytokine. Kawamura et al. (1993) maßen einen Peak der IL-6- und IL-8-Serumwerte 60 Minuten nach Setzen der Aortenklammer im Rahmen einer offenen Herzoperation und konnten eine weiterbestehende Werterhöhung dieser Zytokine für weitere 120 Minuten beobachten.

IL-10 wurde bereits bei Untersuchungen zur Ischämischen Fernkonditionierung an Mäusen als eines der an der Minderung des Reperfusionsschadens beteiligten Zytokine beschrieben (Cai et al. 2012). Ein signifikant steilerer Anstieg des Zytokins IL-10 bei den RIP-Patienten konnte im Rahmen dieser Untersuchung nicht nachgewiesen werden.

Auch andere Studien an Patienten, die sich einer Herzoperation unter Einsatz der Herz-Lungen-Maschine unterzogen, zeigen bezüglich der Zytokine IL-6, IL-8, IL-10 und TNF- α keinen Effekt einer Behandlung mit Ischämischer Konditionierung (Saxena et al. 2013; Bautin et al. 2014).

Hinsichtlich der untersuchten Wachstumsfaktoren ergeben sich jeweils signifikante Gruppenunterschiede vor Beginn der Intervention. Die Messung von bFGF, VEGF und G-CSF erfolgte im Gegensatz zu den restlichen Zytokinen mit dem „BD CBA Flex Set Assays“ (BD Biosciences, Deutschland). Dieser präinterventionelle Gruppenunterschied ist kritisch zu hinterfragen: So konnten eventuell die Blutabnahmen vor dem großen operativen Eingriff nicht absolut garantiert werden. Eine verspätete Probennahme (während oder kurz nach der RIP-Behandlung) könnte schon einen Zytokineffekt nachweisbar machen. Des Weiteren könnten weitere nicht erfasste Gruppenmerkmale bestehen, die einen präoperativen Unterschied verursachen können, wie beispielsweise eine bestehende oder beginnende Diabeteserkrankung oder Tumorerkrankungen.

Ein Gruppenunterschied zeigte sich bei den Wachstumsfaktoren lediglich für den vaskulären, endothelialen Wachstumsfaktor bei ansteigenden Werten in der Behandlungsgruppe gegenüber abnehmenden Werten in der Kontrollgruppe zwischen den Messzeitpunkten T1 (6 Stunden postoperativ) und T2 (48 Stunden postoperativ). Generell konnte nach Eingriffen mit Kardioplegie und extrakorporaler Zirkulation eine Erhöhung von VEGF gezeigt werden (Tofukuji et al. 1998). Der positive Einfluss von VEGF auf die Angiogenese konnte bereits mehrfach nachgewiesen werden (Ferrara et al. 2003). Hinzu kommt, dass das Zielgewebe über einen hinreichend langen Zeitraum (mehr als 2 Wochen) VEGF ausgesetzt sein sollte um die Bildung dauerhaft beständiger Gefäße zu fördern, unabhängig vom Mechanismus der VEGF-Erhöhung (Dor et al. 2002). Daraus folgt der Ansatz, die Ausschüttung körpereigenen VEGFs durch externe Interventionen zu erhöhen. Jedoch konnten nur selten signifikante Konzentrationszunahmen dieses Faktors gezeigt werden. Der nur zwischen zwei Zeitpunkten bestehende Gruppenunterschied für VEGF im Rahmen der RIPHeart-Studie könnte daher mit einer unzureichenden Intervention aus je vier Zyklen fünfminütiger Ischämie und Reperfusion einer oberen Extremität zusammenhängen.

Für G-CSF zeigte sich unabhängig von der Intervention ein signifikanter zeitlicher Verlauf mit einem Werteanstieg zu T1 und anschließendem Werterückgang. G-CSF ist am kardialen Remodelling nach Myokardinfarkt beteiligt (Zhao et al. 2013). Zum einen verbessert es die Herzfunktion und unterstützt die Gefäßproliferation nach Myokardinfarkt, es erhöht jedoch auch das Risiko von Restenosen (Kang et al. 2004).

Zirkulierende Endothelzellen

Im Rahmen der durchgeführten Untersuchung zeigte sich bei den Populationen mit CD45-Nichtexpression und CD146-Expression (CD45- CD146+) unabhängig von der Kombination mit weiteren CD-Molekülen ein abnehmender Kurvenverlauf über die betrachtete Zeit hinweg. CD 146 gilt als typischer Marker für zirkulierende Endothelzellen. Nach Blann et al. (2005) findet sich eine Zunahme dieser Zellen im peripheren Blut bei diversen Krankheiten insbesondere bei denen mit vaskulärer Genese. Diese Zellen scheinen sich im klinischen Alltag auch als Indikatoren für die Effektivität einer Behandlung zu eignen. So deutet eine geringe Anzahl an

zirkulierenden Endothelzellen auf eine positive Beeinflussung im Verlauf von Herz- und Gefäßerkrankungen hin (Mancuso et al. 2003).

Im Rahmen dieser Untersuchung werden als CEC (zirkulierende Endothelzellen) Zellen mit Koexpression von CD34, CD146, CD31 und CD105 bei Nicht-Expression von CD45 (CD45- CD34+ CD146+ CD31+ CD105+) definiert. In anderen Untersuchungen finden sich viele Varianten CECs zu definieren. Mancuso et al. (2001) untersuchten zirkulierende Endothelzellen bei Tumorpatienten und definierten diese als CD45- CD34+ CD146+ CD31+ CD105+ CD106+ Zellen, was der Definition in der vorliegenden Arbeit sehr nahe kommt. Neben diversen anderen Markerkombinationen ist den Arbeiten gleich, dass zirkulierende Endothelzellen CD146 exprimieren und CD133 nicht exprimieren. Nach operativem Eingriff zeigte sich in beiden Gruppen eine Abnahme der CECs. Die Abnahme der zirkulierenden Endothelzellen kann als positiver Effekt der operativen Versorgung der vorliegenden Erkrankung gedeutet werden. Das unterschiedliche Niveau der beiden Gruppen, welches sich als signifikanter Zwischensubjekteffekt zeigt, und der bereits zum präoperativen Zeitpunkt vorliegende signifikante Gruppenunterschied sind kritisch zu hinterfragen. Der beschriebene Effekt bleibt davon jedoch über den zeitlichen Verlauf hinweg unberührt. Es ist möglich, dass die Probandenanzahl und Diversität der operativen Eingriffe bei der Untersuchung der zirkulierenden Endothelzellen als Marker für kardiovaskuläre Schädigung einen Einfluss auf diesen Gruppenunterschied hat. Zu 50% wurden reine aortokoronare Bypass-Operationen durchgeführt, die nahezu gleich in beiden Gruppen verteilt waren. Bei den weiteren Operationen gab es jedoch eine sehr große Diversität an Eingriffen mit Rekonstruktionen oder Ersatz von unterschiedlichen Herzklappen, Tumorexstirpationen, Myektomie nach MORROW, Aorta-ascendens-Ersatz, OP nach DAVID sowie Bentall-OP. Die sehr speziellen Eingriffe sind als Gruppe zusammengefasst betrachtet zwar ähnlich in den Gruppen verteilt, dennoch ist ein besonderer Einfluss bei einer dieser speziellen Operationen mit signifikanten Auswirkungen auf die Ergebnisse denkbar. Hinzu kommt, dass von diesen Zellen zumeist nur eine sehr geringe Anzahl im peripheren Blut vorliegt. Bei Gesunden fand man bei einer Markerexpression von CD45- CD34+ und CD146+ lediglich 8 (6-10) zirkulierende Endothelzellen/ml in der Durchflusszytometrie, die bei akutem Koronarsyndrom auf 14 (8-20) Zellen/ ml anstiegen (Goon, Patrick K Y et al. 2006).

Ein Einfluss der Ischämischen Präkonditionierung auf diese Zellpopulation konnte hier nicht belegt werden.

Die Veränderung reifer zirkulierender Endothelzellen nach Mariucci et al. (2010) mit CD45- CD146+ CD34+ CD133- Markerexpression erreichte nicht das Signifikanzniveau.

Als Einfluss der Ischämischen Fernkonditionierung ist bei den CD45-negativen CD146-positiven Zellen einzig die Entwicklung zwischen T1 zu T2 bei den Zellen mit zusätzlicher CD105- Expression zu deuten. CD105-positive Zellen spielen eine Rolle bei Hämatopoese und Angiogenese, was vor allem bei Tumorwachstum und Metastasierung beobachtet werden konnte (Duff et al. 2003). Die stärkere Abnahme von CD105-positiven Endothelzellen in der Interventionsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe zwischen T1 und T2 lässt eine verstärkte Rekrutierung dieser Zellen aus dem peripheren Blut durch die Intervention vermuten. In Anbetracht der Vielzahl an durchgeführten Analysen von diversen Zelltypen kann dieser einzelne Effekt als möglicher zellulärer Mechanismus der von Przyklenk et al. (1993) beschriebenen positiven Effekte Ischämischer Konditionierung herangezogen werden. Die abschließenden Studienergebnisse von RIPHeart sind noch abzuwarten und dann in Bezug zu den Daten der vorliegenden Arbeit zu setzen.

Im Gegensatz zu der im zeitlichen Verlauf zu beobachtenden Abnahme der CD45- CD146+ Zellen findet sich bei den CD34+ CD133+ Zellen überwiegend eine Zunahme der Zellen nach dem kardiochirurgischen Eingriff. Die Expression von CD34 findet sich sowohl auf Vorläuferzellen als auch auf ausgereiften zirkulierenden Endothelzellen (Goon, Patrick K Y et al. 2006). CD45- CD146+ CD34+ CD133+ Zellen wurden von Rafii et al. (2002) als endotheliale Progenitorzellen bezeichnet. Die Korrelation von zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen (CEPs) und kardialen Risikofaktoren ergab, dass ein geringer Anteil an CEPs für ein kardiovaskuläres Ereignis prädestiniert (Hill et al. 2003).

Die durchgeführte Untersuchung ergab für die nach Mariucci et al. (2010) bezeichneten zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen zu geringe Zellzahlen um eine aussagekräftige Statistik durchzuführen. In den von Mariucci et al. (2010) bezeichneten reifen CECs (CD45- CD146+ CD34+ CD133-) ergaben sich keine signifikanten Ergebnisse.

Die Betrachtung der CD45-negativen-bis schwach positiven, CD34-positiven-, CD133-positiven, CD146-negativen- Zellpopulation ergab einen signifikanten zeitlichen Verlauf. Zudem fand sich zwischen T0 und T1, sowie zwischen T0 und T2 ein signifikanter Gruppenunterschied. Die Ischämische Präkonditionierung vermag zwischen diesen Messzeitpunkten vermutlich eine schnellere Rekrutierung der genannten Vorläuferzellen aus dem peripheren Blut zu bewirken. Ob diese Zellen ins kardiale Zielgewebe gelangen, müsste durch entsprechende Untersuchungen am Zielgewebe verifiziert werden. Eine solche Untersuchung könnte die von Lim et al. (2010) aufgestellte Hypothese, dass die Fernkonditionierung über humorale Faktoren erreicht wird, um einen weiteren Mechanismus erweitern.

Ein weiterer möglicher Effekt der Ischämischen Fernkonditionierung zeigte sich in signifikanten Gruppenunterschieden bei der CD45-negativ-bis schwach positiven, CD34-positiven-, CD133-positiven- Zellpopulation durch deutlich steiler ansteigende Zellzahlen in der Interventionsgruppe zwischen 48-Stunden postoperativ und Entlassungszeitpunkt. Auch insgesamt lag bei der Behandlungsgruppe ein zum Entlassungszeitpunkt deutlich höheres Zellzahlniveau vor als präoperativ.

Die im Rahmen dieser Arbeit vorliegende Gruppengröße ist noch nicht ausreichend für abschließende Bewertungen. Hinsichtlich der Rekrutierung wäre beispielsweise eine größere Eingrenzung der in die Untersuchung eingeschlossenen operativen Eingriffsarten vorteilhaft, um ähnliche Zeiten an der Herz-Lungen-Maschine zu gewährleisten, da ein Einfluss unterschiedlich langer Zeiten auf die erhobenen Parameter wahrscheinlich ist. Der Einfluss des operativen Eingriffs am Herzen auf den menschlichen Organismus kann als enorm bezeichnet werden. Der eventuell hervorgerufene Effekt der hier beschriebenen Intervention auf zellulärer Ebene und auf die Zytokine könnte im Verhältnis dazu so gering sein, dass er neben der massiven Reaktion des Körpers auf die Operation nicht mehr statistisch nachweisbar ist. Andere Autoren beschrieben bislang, dass sich die Ischämische Konditionierung nicht nur über humorale Faktoren, sondern auch neuronale Mechanismen auswirkt (Lim et al. 2010). Als vermittelnde Stoffe sind zudem Adenosin und ebenso Bradykinin beteiligt (Liu et al. 1991, Schoemaker und van Heijningen 2000), welche durch Aktivierung der Proteinkinase C die Wachstumsregulation und Differenzierung verstärken (Goto et al. 1995).

Für die Klärung des zugrunde liegenden Mechanismus könnte eine Untersuchung des Verhaltens der Zytokine und Endothelzellen ohne kardiochirurgischen Eingriff an einem geeigneten Patientenkollektiv sinnvoll sein.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit zeigt den Einfluss eines kardiochirurgischen Eingriffs auf die untersuchten Zytokine sowie auf unterschiedliche Populationen der zirkulierenden Endothelzellen. Es konnte eine postoperative Stimulation der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8 sowie des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 gefunden werden. Eine Herzoperation mit Einsatz der extrakorporalen Zirkulation stimuliert das Immunsystem in den ersten Stunden bis Tagen nach dem Eingriff zur Sekretion entzündungsfördernder sowie -hemmender Stoffe.

Ein Einfluss der Ischämischen Präkonditionierung mittels vier Perioden fünfminütiger Ischämie und darauffolgender Reperfusion an einer oberen Extremität konnte beim Tumor-Nekrose-Faktor nachgewiesen werden. Die Patienten reagierten in den ersten zwei postoperativen Tagen mit einer Abnahme des entzündungsfördernden Tumor-Nekrose- Faktors (TNF) im peripheren Blut, wenn sie der Ischämischen Präkonditionierung unterzogen wurden, wohingegen TNF bei der Kontrollgruppe in diesem Zeitraum anstieg.

Die durch Expression des Oberflächenmoleküls CD146 charakterisierten zirkulierenden Endothelzellen zeigten abnehmende Werte nach der Herzoperation. Da sie als Marker für die Effektivität eines Eingriffs im Rahmen kardiovaskulärer Krankheiten gelten, könnte diese abnehmende Zellzahl einen positiven Effekt der Operation unterstreichen. Der Einfluss der Ischämischen Präkonditionierung konnte lediglich zwischen T1 und T2 bei der CD45- CD146+ CD105+ Zellpopulation gezeigt werden. Die Marker belegen, dass diese Zellpopulation zirkulierende Endothelzellen umfasst.

Die hier untersuchten CD34+ und CD133+ Vorläuferzellen traten nach dem Eingriff in höherer Zahl im peripheren Blut auf. Endotheliale Progenitorzellen mit CD45- CD34+ CD133+ CD146- nahmen bei Behandlung mit Ischämischer Fernkonditionierung direkt postoperativ ab, was eine schnellere Rekrutierung dieser Zellen in das Zielgewebe annehmen lässt.

Die abschließenden Ergebnisse bezüglich des klinischen Einflusses der Ischämischen Fernkonditionierung im Rahmen der Multicenterstudie stehen noch aus. Sollte sich hierbei der erhoffte positive Effekt auf Gesamtmortalität, postoperative vaskuläre Ereignisse (Myokardinfarkt oder Schlaganfall), die Dauer der intensivmedizinischen Behandlung und Hospitalisierung sowie neu aufgetretenes

Vorhofflimmern oder Delirium zeigen, gilt es weitere Untersuchungen zur Klärung des zugrunde liegenden Mechanismus zu initiieren, da anhand der hier vorliegenden Ergebnisse noch keine endgültigen Schlüsse gezogen werden können.

6 Literaturverzeichnis

- Anversa, Piero; Leri, Annarosa; Kajstura, Jan: Cardiac regeneration. *J Am Coll Cardiol* (2006) (9), S. 1769–1776.
- Balibrea, J. L.; Bullon, A.; de la Fuente, A; de la Alarcon, A; Fariñas, J.; Collantes, P. et al. (1975): Myocardial ultrastructural changes during extracorporeal circulation with anoxic cardiac arrest and its prevention by coronary perfusion. Experimental study. In: *Thorax* 30 (4), S. 371–381.
- Bautin, A. E.; Galagudza, M. M.; Datsenko, S. V.; Tashkhanov, D. M.; Marichev, A. O.; Bakanov, A. Iu et al. (2014): [Effects of remote ischemic preconditioning on perioperative period in elective aortic valve replacement]. In: *Anesteziologija i reanimatologija* (3), S. 11–17.
- BD Biosciences (2010): CD Marker Handbook Human and Mouse. Online verfügbar unter https://www.bdbiosciences.com/documents/cd_marker_handbook.pdf, zuletzt geprüft am 27.02.2015.
- Beltrami, Antonio P.; Barlucchi, Laura; Torella, Daniele; Baker, Mathue; Limana, Federica; Chimenti, Stefano et al.: Adult Cardiac Stem Cells Are Multipotent and Support Myocardial Regeneration. *Cell* (2003) (6), S. 763–776.
- Bernink, F.J.P.; Timmers, L.; Beek, A. M.; Diamant, M.; Roos, S. T.; van Rossum, A. C.; Appelman, Y.: Progression in attenuating myocardial reperfusion injury: An overview. *International Journal of Cardiology* (2013).
- Blann, Andrew D.; Woywodt, Alexander; Bertolini, Francesco; Bull, Todd M.; Buyon, Jill P.; Clancy, Robert M. et al.: Circulating endothelial cells. Biomarker of vascular disease. *Thromb. Haemost.* (2005) (2), S. 228–235.
- Boheler, Kenneth R.; Czyz, Jaroslaw; Tweedie, David; Yang, Huang-Tian; Anisimov, Sergey V.; Wobus, Anna M. (2002): Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes. In: *Circ Res* 91 (3), S. 189–201.
- Bühling, K. J.; Lepenies, J.; Witt, K. (2008): Intensivkurs: Allgemeine und Spezielle Pathologie. 4., Aufl. München: Urban & Fischer in Elsevier (Klinik).
- Bundesministerium der Justiz (1990; zuletzt geändert 2011): Embryonenschutzgesetz - ESchG.

- Cai, Zheqing P.; Parajuli, Nirmal; Zheng, Xiaoxu; Becker, Lewis: Remote ischemic preconditioning confers late protection against myocardial ischemia-reperfusion injury in mice by upregulating interleukin-10. *Basic research in cardiology* (2012) (4), S. 277.
- De'Ath, Henry D.; Manson, Joanna; Davenport, Ross; Glasgow, Simon; Renfrew, Ian; Davies, L. Ceri et al.: Trauma-Induced Secondary Cardiac Injury Is Associated With Hyperacute Elevations in Inflammatory Cytokines. *Shock* (2013) (5), S. 415–420.
- Donndorf, Peter; Kundt, Guenther; Kaminski, Alexander; Yerebakan, Can; Liebold, Andreas; Steinhoff, Gustav; Glass, Aenne: Intramyocardial bone marrow stem cell transplantation during coronary artery bypass surgery: A meta-analysis. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* (2011) (4), S. 911–920.
- Dor, Yuval; Djonov, Valentin; Abramovitch, Rinat; Itin, Ahuva; Fishman, Glenn I.; Carmeliet, Peter et al.: Conditional switching of VEGF provides new insights into adult neovascularization and pro-angiogenic therapy. *EMBO J.* (2002) (8), S. 1939–1947.
- Duff, Sarah E.; Li, Chenggang; Garland, John M.; Kumar, Shant: CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *FASEB J* (2003) (9), S. 984–992.
- Emura, Iwao; Usuda, Hiroyuki: Histopathological and cytological examination of autopsy cases with multiple organ dysfunction syndromes. *Pathology International* (2010) (6), S. 443–451.
- Fang, Jun; Chen, Lianglong; Fan, Lin; Wu, Liming; Chen, Xiangqi; Li, Weiwei et al.: Enhanced therapeutic effects of mesenchymal stem cells on myocardial infarction by ischemic postconditioning through paracrine mechanisms in rats. *J. Mol. Cell. Cardiol.* (2011) (5), S. 839–847.
- Ferrara, Napoleone; Gerber, Hans-Peter; LeCouter, Jennifer: The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med.* (2003) (6), S. 669–676.
- Gesundheitsberichterstattung des Bundes (2013a): Herzoperationen - Zeitreihe.
Online verfügbar unter http://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/WS0100/_XWD_FORMPROC?TARGET=&PAGE=_XWD_2&OPINDEX=4&HANDLER=_XWD_CUBE.SETPGS&DATACUBE=_X

WD_30&D.100=10101, zuletzt aktualisiert am 20.11.2013, zuletzt geprüft am 20.11.2013.

Gesundheitsberichterstattung des Bundes (2013b): Sterbefälle, Sterbeziffer, Ränge, Anteile der 10/20/50/100 häufigsten Todesursachen (ab 1998). Online verfügbar unter http://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/dboowasys921.xwdevkit/xwd_init?gbe.isgbetol/xs_start_neu/&p_aid=3&p_aid=62909983&nummer=516&p_sprache=D&p_indsp=4065&p_aid=20396888, zuletzt aktualisiert am 20.11.2013, zuletzt geprüft am 20.11.2013.

Gho, B. C.; Schoemaker, R. G.; van den Doel, M A; Duncker, D. J.; Verdouw, P. D. (1996): Myocardial protection by brief ischemia in noncardiac tissue. In: *Circulation* 94 (9), S. 2193–2200.

Gibbons, Deena; Fleming, Paul; Virasami, Alex; Michel, Marie-Laure; Sebire, Neil J.; Costeloe, Kate et al.: Interleukin-8 (CXCL8) production is a signatory T cell effector function of human newborn infants. *Nature medicine* (2014) (10), S. 1206–1210.

Goon, Patrick K Y; Boos, Christopher J.; Stonelake, Paul S.; Blann, Andrew D.; Lip, Gregory Y H: Detection and quantification of mature circulating endothelial cells using flow cytometry and immunomagnetic beads: a methodological comparison. *Thrombosis and haemostasis* (2006) (1), S. 45–52.

Gospodarowicz, D.; Moran, J.; Braun, D.; Birdwell, C. (1976): Clonal growth of bovine vascular endothelial cells: fibroblast growth factor as a survival agent. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73 (11), S. 4120–4124.

Goto, M.; Liu, Y.; Yang, X. M.; Ardell, J. L.; Cohen, M. V.; Downey, J. M. (1995): Role of bradykinin in protection of ischemic preconditioning in rabbit hearts. In: *Circ. Res.* 77 (3), S. 611–621.

greiner bio-one: Gebrauchsanleitung Leucosep™ (163 288, 163 289, 163 290, 227 288, 227 289, 227 290), zuletzt geprüft am 11.11.2013.

Gullestad, Lars; Ueland, Thor; Vinge, Leif Erik; Finsen, Alexandra; Yndestad, Arne; Aukrust, Pål: Inflammatory cytokines in heart failure: mediators and markers. *Cardiology* (2012) (1), S. 23–35.

- Hill, Jonathan M.; Zalos, Gloria; Halcox, Julian P J; Schenke, William H.; Waclawiw, Myron A.; Quyyumi, Arshed A.; Finkel, Toren: Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *The New England journal of medicine* (2003) (7), S. 593–600.
- Holmes, W. E.; Lee, J.; Kuang, W. J.; Rice, G. C.; Wood, W. I. (1991): Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor. In: *Science (New York, N.Y.)* 253 (5025), S. 1278–1280.
- Itkin, Tomer; Ludin, Aya; Gradus, Ben; Gur-Cohen, Shiri; Kalinkovich, Alexander; Schajnovitz, Amir et al.: FGF-2 expands murine hematopoietic stem and progenitor cells via proliferation of stromal cells, c-Kit activation, and CXCL12 down-regulation. *Blood* (2012) (9), S. 1843–1855.
- Jeevanantham, V.; Butler, M.; Saad, A.; Abdel-Latif, A.; Zuba-Surma, E. K.; Dawn, B.: Adult Bone Marrow Cell Therapy Improves Survival and Induces Long-Term Improvement in Cardiac Parameters: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Circulation* (2012) (5), S. 551–568.
- Jiang, Zhi-Sheng; Padua, Raymond R.; Ju, Haisong; Doble, Bradley W.; Jin, Yan; Hao, Jianming et al.: Acute protection of ischemic heart by FGF-2: involvement of FGF-2 receptors and protein kinase C. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (2002) (3), S. H1071-80.
- Kang, Hyun-Jae; Kim, Hyo-Soo; Zhang, Shu-Ying; Park, Kyung-Woo; Cho, Hyun-Jai; Koo, Bon-Kwon et al.: Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilised with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomised clinical trial. *Lancet (London, England)* (2004) (9411), S. 751–756.
- Kawamura, T.; Wakusawa, R.; Okada, K.; Inada, S. (1993): Elevation of cytokines during open heart surgery with cardiopulmonary bypass: participation of interleukin 8 and 6 in reperfusion injury. In: *Canadian journal of anaesthesia = Journal canadien d'anesthésie* 40 (11), S. 1016–1021.
- Korbling, M.; Estrov, Z.; Champlin, R.: Adult stem cells and tissue repair. *Bone Marrow Transplant* (2003), S. S23-4.

- Lang, Roberto M.; Bierig, Michelle; Devereux, Richard B.; Flachskampf, Frank A.; Foster, Elyse; Pellikka, Patricia A. et al.: Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. *J Am Soc Echocardiogr* (2005) (12), S. 1440–1463.
- Lecour, S.; James, R. W.: When are pro-inflammatory cytokines SAFE in heart failure? *European Heart Journal* (2011) (6), S. 680–685.
- Li, Aihua; Dubey, Seema; Varney, Michelle L.; Dave, Bhavana J.; Singh, Rakesh K. (2003): IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. In: *J Immunol* 170 (6), S. 3369–3376.
- Lim, Shiang Y.; Yellon, Derek M.; Hausenloy, Derek J.: The neural and humoral pathways in remote limb ischemic preconditioning. *Basic Res. Cardiol.* (2010) (5), S. 651–655.
- Lin, Y.; Weisdorf, D. J.; Solovey, A.; Hebbel, R. P.: Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *The Journal of clinical investigation* (2000) (1), S. 71–77.
- Liu, G. S.; Thornton, J.; Van Winkle, D M; Stanley, A. W.; Olsson, R. A.; Downey, J. M. (1991): Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in rabbit heart. In: *Circulation* 84 (1), S. 350–356.
- Löffler, Georg; Petrides, Petro E.; Heinrich, Peter C. (2007): Biochemie und Pathobiochemie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Lønborg, Jacob; Kelbaek, Henning; Vejlstrup, Niels; Jørgensen, Erik; Helqvist, Steffen; Saunamäki, Kari et al.: Cardioprotective effects of ischemic postconditioning in patients treated with primary percutaneous coronary intervention, evaluated by magnetic resonance. *Circ Cardiovasc Interv* (2010) (1), S. 34–41.
- Loukogeorgakis, Stavros P.; Panagiotidou, Anna T.; Broadhead, Michael W.; Donald, Ann; Deanfield, John E.; MacAllister, Raymond J.: Remote ischemic

- preconditioning provides early and late protection against endothelial ischemia-reperfusion injury in humans: role of the autonomic nervous system. *J. Am. Coll. Cardiol.* (2005) (3), S. 450–456.
- Ma, Xiaojing; Zhang, Xinghua; Li, Chunmei; Luo, Man: Effect of postconditioning on coronary blood flow velocity and endothelial function and LV recovery after myocardial infarction. *J Interv Cardiol* (2006) (5), S. 367–375.
- Mancuso, P.; Burlini, A.; Pruner, G.; Goldhirsch, A.; Martinelli, G.; Bertolini, F. (2001): Resting and activated endothelial cells are increased in the peripheral blood of cancer patients. In: *Blood* 97 (11), S. 3658–3661.
- Mancuso, Patrizia; Calleri, Angelica; Cassi, Cristina; Gobbi, Alberto; Capillo, Manuela; Pruner, Giancarlo et al. (2003): Circulating endothelial cells as a novel marker of angiogenesis. In: *Adv Exp Med Biol* 522, S. 83–97.
- Mann, Douglas L. (2013): Inflammatory Mediators and the Failing Heart. In: *Circ Res*, 23.12.2013. Online verfügbar unter <http://circres.ahajournals.org/content/91/11/988.full>, zuletzt geprüft am 23.12.2013.
- Mariucci, S.; Rovati, B.; Bencardino, K.; Manzoni, M.; Danova, M.: Flow cytometric detection of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells in healthy subjects. *International Journal of Laboratory Hematology* (2010) (1p1), S. e40.
- Mathison, Megumi; Gersch, Robert P.; Nasser, Ahmed; Lilo, Sarit; Korman, Mallory; Fourman, Mitchell et al.: In vivo cardiac cellular reprogramming efficacy is enhanced by angiogenic preconditioning of the infarcted myocardium with vascular endothelial growth factor. *J Am Heart Assoc* (2012) (6), S. e005652.
- Meybohm, Patrick (2013): Remote Ischaemic Preconditioning for Heart Surgery (RIPHeart-Study).
- Moazzami, Kasra; Roohi, Aria; Moazzami, Bobak: Granulocyte colony stimulating factor therapy for acute myocardial infarction. *Cochrane Database Syst Rev* (2013), S. CD008844.

- Murry, C. E.; Jennings, R. B.; Reimer, K. A. (1986): Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. In: *Circulation* 74 (5), S. 1124–1136.
- Nesselmann, C.; Kaminski, A.; Steinhoff, G.: Cardiac stem cell therapy. *Herz* (2011) (2), S. 121–134.
- Oladipupo, Sunday S.; Smith, Craig; Santeford, Andrea; Park, Changwon; Sene, Abdoulaye; Wiley, Luke A. et al.: Endothelial cell FGF signaling is required for injury response but not for vascular homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (2014) (37), S. 13379–13384.
- Oral, H.; Kapadia, S.; Nakano, M.; Torre-Amione, G.; Lee, J.; Lee-Jackson, D. et al. (1995): Tumor necrosis factor-alpha and the failing human heart. In: *Clin Cardiol* 18 (9 Suppl 4), S. IV20-7.
- Padua, R. R.; Merle, P. L.; Doble, B. W.; Yu, C. H.; Zahradka, P.; Pierce, G. N. et al.: FGF-2-induced negative inotropism and cardioprotection are inhibited by chelerythrine: involvement of sarcolemmal calcium-independent protein kinase C. *J Mol Cell Cardiol* (1998) (12), S. 2695–2709.
- Pomerantz, B. J.; Reznikov, L. L.; Harken, A. H.; Dinarello, C. A.: Inhibition of caspase 1 reduces human myocardial ischemic dysfunction via inhibition of IL-18 and IL-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (2001) (5), S. 2871–2876.
- Przyklenk, K.; Bauer, B.; Ovize, M.; Kloner, R. A.; Whittaker, P. (1993): Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. In: *Circulation* 87 (3), S. 893–899.
- Quaini, Federico; Urbanek, Konrad; Beltrami, Antonio P.; Finato, Nicoletta; Beltrami, Carlo A.; Nadal-Ginard, Bernardo et al.: Chimerism of the Transplanted Heart. *N Engl J Med* (2002) (1), S. 5–15.
- Rafii, Shahin; Lyden, David; Benezra, Robert; Hattori, Koichi; Heissig, Beate: Vascular and haematopoietic stem cells: novel targets for anti-angiogenesis therapy? *Nature reviews. Cancer* (2002) (11), S. 826–835.
- RKI (2013): RKI - Gesundheitsberichte für Deutschland - Kernaussagen des Gesundheitsberichts "Gesundheit in Deutschland". Online verfügbar unter:

http://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GesInDtld/kernaussagen_inhalt.html?nn=2379316#doc2379334bodyText1, zuletzt aktualisiert am 20.11.2013, zuletzt geprüft am 20.11.2013.

- Roederer, M. (2001): Spectral compensation for flow cytometry: visualization artifacts, limitations, and caveats. In: *Cytometry* 45 (3), S. 194–205.
- Rumyantsev, P. P.; Borisov, A. (1987): DNA synthesis in myocytes from different myocardial compartments of young rats in norm, after experimental infarction and in vitro. In: *Biomed. Biochim. Acta* 46 (8-9), S. S610-5.
- Sack, Ulrich (Hg.) (2007): Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie ; 163 Tabellen. Basel, Freiburg [Breisgau], Paris, London, New York, Bangalore, Bangkok, Singapore, Tokyo, Sydney: Karger.
- Saxena, Pankaj; Aggarwal, Shashi; Misso, Neil L.; Passage, Jurgen; Newman, Mark A J; Thompson, Philip J. et al.: Remote ischaemic preconditioning down-regulates kinin receptor expression in neutrophils of patients undergoing heart surgery. *Interactive cardiovascular and thoracic surgery* (2013) (4), S. 653–658.
- Schmid, Christof; Philipp, Alois (2011): Leitfaden extrakorporale Zirkulation. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Schmidt, David E.; Manca, Marco; Hoefer, Imo E.: Circulating endothelial cells in coronary artery disease and acute coronary syndrome. *Trends in cardiovascular medicine* (2015).
- Schoemaker, R. G.; van Heijningen, C L (2000): Bradykinin mediates cardiac preconditioning at a distance. In: *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 278 (5), S. H1571-6.
- Seta, Y.; Shan, K.; Bozkurt, B.; Oral, H.; Mann, D. L. (1996): Basic mechanisms in heart failure: the cytokine hypothesis. In: *J Card Fail* 2 (3), S. 243–249.
- Shibuya, M.: Vascular endothelial growth factor and its receptor system: physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases. *Journal of Biochemistry* (2012) (1), S. 13–19.

- Sörensson, Peder; Saleh, Nawzad; Bouvier, Frederic; Böhm, Felix; Settergren, Magnus; Caidahl, Kenneth et al.: Effect of postconditioning on infarct size in patients with ST elevation myocardial infarction. *Heart* (2010) (21), S. 1710–1715.
- Staat, Patrick; Rioufol, Gilles; Piot, Christophe; Cottin, Yves; Cung, Thien Tri; L'Huillier, Isabelle et al.: Postconditioning the human heart. *Circulation* (2005) (14), S. 2143–2148.
- Strauer, Bodo E.; Brehm, Michael; Zeus, Tobias; Kosterling, Matthias; Hernandez, Anna; Sorg, Rudiger V. et al. (2002): Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. In: *Circulation* 106 (15), S. 1913–1918.
- Stumpf, Christian; Petzi, Sebastian; Seybold, Katrin; Wasmeier, Gerald; Arnold, Martin; Raaz, Dorette et al.: Atorvastatin enhances interleukin-10 levels and improves cardiac function in rats after acute myocardial infarction. *Clinical Science* (2009) (1), S. 45.
- Takahashi, T.; Kalka, C.; Masuda, H.; Chen, D.; Silver, M.; Kearney, M. et al.: Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* (1999) (4), S. 434–438.
- Thibault, Hélène; Piot, Christophe; Staat, Patrick; Bontemps, Laurence; Sportouch, Catherine; Rioufol, Gilles et al.: Long-term benefit of postconditioning. *Circulation* (2008) (8), S. 1037–1044.
- Tofukuji, M.; Metais, C.; Li, J.; Franklin, A.; Simons, M.; Sellke, F. W. (1998): Myocardial VEGF expression after cardiopulmonary bypass and cardioplegia. In: *Circulation* 98 (19 Suppl), S. II242-6; discussion II247-8.
- Torre-Amione, G.; Kapadia, S.; Lee, J.; Durand, J. B.; Bies, R. D.; Young, J. B.; Mann, D. L. (1996): Tumor necrosis factor-alpha and tumor necrosis factor receptors in the failing human heart. In: *Circulation* 93 (4), S. 704–711.
- Vandervelde, S.; van Luyn, M J A; Tio, R. A.; Harmsen, M. C.: Signaling factors in stem cell-mediated repair of infarcted myocardium. *J Mol Cell Cardiol* (2005) (2), S. 363–376.

- Varga, T.; Somogyi, E.; Soós, J.; Békássy, S.; Arvay, A. (1975): Extracorporalis keringés alkalmával kialakuló humán anoxiás szívizomkárosodások elektronmikroszkópos vizsgálata. In: *Morphol Igazságügyi Orv Sz* 15 (1), S. 23–29.
- Walsh, Stewart R.; Tang, Tjun Y.; Kullar, Peter; Jenkins, David P.; Dutka, David P.; Gaunt, Michael E.: Ischaemic preconditioning during cardiac surgery: systematic review and meta-analysis of perioperative outcomes in randomised clinical trials. *Eur J Cardiothorac Surg* (2008) (5), S. 985–994.
- Wolfrum, Sebastian; Schneider, Kathrin; Heidbreder, Marc; Nienstedt, Julie; Dominiak, Peter; Dendorfer, Andreas (2002): Remote preconditioning protects the heart by activating myocardial PKCepsilon-isoform. In: *Cardiovasc. Res.* 55 (3), S. 583–589.
- World Medical Association: Declaration of Helsinki: Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. *JAMA* (2013).
- Yang, Xin-Chun; Liu, Yu; Wang, Le-Feng; Cui, Liang; Wang, Tie; Ge, Yong-Gui et al. (2007): Reduction in myocardial infarct size by postconditioning in patients after percutaneous coronary intervention. In: *J Invasive Cardiol* 19 (10), S. 424–430.
- Yellon, D. M.; Alkhulaifi, A. M.; Pugsley, W. B. (1993): Preconditioning the human myocardium. In: *Lancet* 342 (8866), S. 276–277.
- Zhao, Qingbin; Sun, Chaofeng; Xu, Xin; Zhou, Juan; Wu, Yue; Tian, Yuling et al.: Early use of granulocyte colony stimulating factor improves survival in a rabbit model of chronic myocardial ischemia. *J Cardiol* (2013) (1), S. 87–94.
- Zhao, Zhi-Qing; Corvera, Joel S.; Halkos, Michael E.; Kerendi, Faraz; Wang, Ning-Ping; Guyton, Robert A.; Vinten-Johansen, Jakob: Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* (2003) (2), S. H579-88.
- Ziemer, Gerhard; Haverich, Axel (2010): Herzchirurgie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Anhang

Thesen

1. Die Entwicklung der Herz-Lungen-Maschine war ein Meilenstein für die Kardiochirurgie wie sie heute Verwendung findet. Neben dem großen klinischen Nutzen für den Eingriff sind auch eine Vielzahl an Nebenwirkungen bekannt, unter anderem der sich auf viele Organsysteme auswirkende Reperfusionsschaden.
2. Gegenstand aktueller Forschungen ist es den Reperfusionsschaden weiter zu minimieren, unter anderem mittels Ischämischer Konditionierung. Ischämische Fernkonditionierung gilt als hoffnungsvolle, nicht-invasive Methode, deren Effektivität im Rahmen der RIPHeart-Studie untersucht wird.
3. Die Durchflusszytometrie ist ein geeignetes Verfahren zur Analyse von Zytokinen und Zellpopulationen um den zeitlichen Verlauf dieser Parameter im Rahmen von kardiochirurgischen Eingriffen und den Einfluss der Ischämischen Fernkonditionierung zu untersuchen.
4. Herzoperationen stimulieren die postoperative Ausschüttung sowohl anti- (IL-6, IL-8) als auch proinflammatorischer (IL-10) Zytokine.
5. Die Ischämische Fernkonditionierung begrenzt möglicherweise einen Anstieg des entzündungsfördernden TNF nach kardiochirurgischem Eingriff.
6. Eine signifikante postoperative Abnahme von zirkulierenden Endothelzellen über die Zeit kann den positiven Effekt des operativen Eingriffs zeigen.
7. Die Ischämische Präkonditionierung hat möglicherweise einen Einfluss auf zirkulierende Endothelzellen mit CD105-Expression.
8. Die Abnahme der mobilisierten Progenitorzellen nach dem Eingriff kann deren Rekrutierung ins Zielgewebe im Rahmen kardiovaskulärer Ereignisse unterstreichen.
9. Der Einfluss der Ischämischen Fernkonditionierung auf zirkulierende endotheliale Progenitorzellen und zirkulierende Endothelzellen sowie Zytokine/Wachstumsfaktoren zeigte sich nur vereinzelt. Für die Klärung eines zugrunde liegenden Mechanismus sind klinische Studienergebnisse abzuwarten und neue Untersuchungen ohne den enormen Einfluss der Herzoperation empfehlenswert.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die genannten Hilfsmittel genutzt und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Die vorgelegte Dissertation wurde bisher weder im Ausland noch im Inland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Rostock, den 20.09.2015

Anna Stockheim

Danksagung

Mein herzlicher Dank geht an Herrn Prof. Dr. med. Gustav Steinhoff für die Überlassung dieses überaus interessanten Themas.

Frau Dr. rer. nat. Cornelia A. Lux möchte ich danken für das präzise Einarbeiten in die Labortechnik und in den Ablauf der Experimente, für die Hilfestellung vom Beginn der Studie bis hin zum Fertigstellen meiner Doktorarbeit. Ich danke ihr für die Übernahme der Experimente, wenn es mir nicht möglich war und die konstruktive Kritik, die meine Arbeit entscheidend vorangetrieben hat.

Herrn PD Dr. med. habil. Peter J. Donndorf möchte ich danken für seine ausgezeichnete Betreuung und Wertschätzung meiner Arbeit, für seine viel investierte Zeit und seine verlässliche und schnelle Hilfsbereitschaft.

Allen Mitarbeitern des Forschungslabors RTC sowie Philipp S. Köntges, die bei der Datenerhebung mitgewirkt haben, möchte ich ein herzliches Dankeschön sagen.

Für die ausgezeichnete Zusammenarbeit zwischen Anästhesisten, Kardiotechnikern und Pflegepersonal der Universitätsmedizin Rostock und deren Probenakquirierung danke ich vielmals. Für die Initiierung Rostocks als ein Ort der Multicenterstudie RIPHeart danke ich Herrn PD Dr. med. habil. Jan P. Rösner.

Bei Herrn Prof. Dr.-Ing. Günther Kundt bedanke ich mich für die Hilfestellung bei der statistischen Auswertung der Daten. Frau Dipl.-Math. Doreen Diedrich danke ich für die Hilfe der Interpretation der statistischen Daten und ihre mir und anderen Medizinstudenten entgegengebrachte große Wertschätzung.

Die Zeit der Entstehung dieser Arbeit ist für mich privat mit der Gründung meiner kleinen Familie verbunden. Es war für mich keine Selbstverständlichkeit in dieser Zeit eine so große Unterstützung für die Fortführung der Experimente zu bekommen und mir so das Weiterarbeiten an dieser Arbeit zu ermöglichen. Dafür danke ich allen, die mir dabei geholfen haben.

Meiner Familie, allen voran meinen Eltern, danke ich für ihre Liebe und Unterstützung insbesondere während des langen Studiums, ihren Zuspruch und ihren Glauben an mich.

Ganz besonders danke ich meinem Ehemann, Daniel Stockheim, für seine große Liebe und seine Geduld, aber auch für die Hilfe und Unterstützung beim Entstehungsprozess dieser Arbeit.

Danke an alle, die mit dem Lesen und Anmerken geholfen haben die vorliegende Arbeit entscheidend zu verbessern.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Anna Stockheim
Geburtsdatum, -ort	21.09.1988, Berlin-Friedrichshain
Geburtsname	Baresel
Staatsangehörigkeit	deutsch

Ausbildung

08/2001- 06/2008	Einstein-Gymnasium Neuenhagen b. Berlin, Abschluss mit dem Abitur
Seit 10/2008	Studium der Humanmedizin an der Universität Rostock
Seit 03/2011	Doktorandin in der Klinik für Herzchirurgie unter Prof. Dr. med. G. Steinhoff
10/2010	1. Staatsexamen
10/2014	2. Staatsexamen, schriftlicher Teil

Wissenschaftliche Veröffentlichungen

P. Donndorf, A. Baresel, C. Lux, P. Köntges, J. Roesner, A. Alms, G. Steinhoff (2013). Remote ischemic preconditioning prior to on-pump cardiac surgery affects progenitor cell recruitment to the peripheral blood: Preliminary results from a prospective cohort study. *The Thoracic and Cardiovascular Surgeon*, 61- SC88.